



Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis
Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular
CSIC- Universidad de Sevilla

Regulación por cianuro del desarrollo del pelo radical y la respuesta a patógenos en *Arabidopsis thaliana*

Trabajo realizado para optar al grado de doctora por la Licenciada

Lucía Arenas Alfonseca

DIRECTORES DE TESIS

Dra. Irene García Fernández
Investigadora distinguida CSIC

Dr. Luis Carlos Romero González
Investigador Científico CSIC

TUTOR DE TESIS

Dr. Manuel Hervás Morón
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

Esta tesis ha sido realizada en el Instituto de Bioquímica Vegetal y fotosíntesis de Sevilla, centro mixto de la Universidad de Sevilla y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, gracias a una beca de Formación de Personal Investigador (BES-2014-069182) con financiación del proyecto BIO2013-44648-P, del que los doctores Luis Carlos Romero y Cecilia Gotor Martínez han sido los investigadores principales.

Mi primer agradecimiento va dirigido a mis directores de tesis, gracias por haberme dado la oportunidad de continuar mi formación realizando esta tesis doctoral, y por prestaros a guiarme en este camino. Gracias Irene, por tus infinitas horas de dedicación conmigo, por tu paciencia al enseñarme desde el verdadero principio, cuando no sabía ni sembrar una placa. Gracias por mostrarme tu pasión y entusiasmo por la ciencia, que han hecho que yo también haya caído en la trampa. Sin ti y sin tu ayuda diaria codo con codo en el laboratorio esta tesis no habría sido posible. Gracias Luis por tu experiencia, templanza y por ser un referente para mí como persona y profesional durante esta tesis doctoral. Gracias Cecilia, porque a pesar de no figurar formalmente, has sido la tercera directora en la “sombra”. Gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme y aportar una visión práctica a todo.

I would like to thank Prof. Philip Benfey for letting me train in such a great lab during my pre-doctoral stay in United States. Thanks Masashi Yamada for making my stay easier, this stay wouldn't have been possible without you. Thanks to everybody in the group for making me feel at home and always helping me.

No tengo palabras para agradecer a mis compañeras de laboratorio todo lo que han aportado a mi tesis y a mi vida. Gracias Inma, mi doctora en alma preferida, sin la cual nada de esto habría sido posible. Gracias por tu infinita sabiduría, por saber siempre las respuestas a todas mis dudas, por ofrecerme siempre tu ayuda incluso antes de pedírtela, por ser irremplazable e insustituible y por demostrar a todos que no hace falta una tesis para ser el pilar sobre el que se apoya todo un grupo. Gracias por tus valores como persona, por tu cariño, por los consejos mutuos, y por nuestras conversaciones profundas en las que arreglamos el mundo en lo que nos dura una mandarina, ¡te espero en nuestra isla! Gracias a mi punteña preferida, Anita, por ser tan especial, auténtica y divertida, y gracias por tu ayuda en nuestras infinitas tardes solas en el labo. Gracias Ángeles por tu experiencia y energía positiva, por ser la albaceteña más “salá” que conozco, y por mostrarme que hay que luchar por lo que uno quiere, el que la sigue la consigue. Gracias a la nueva Ana, que ha conseguido ganarnos a todos en un abrir y cerrar de

ojos. Gracias por darnos estos momentos únicos, gracias por tus despistes y ocurrencias, por hacernos reír hasta llorar, bendita suerte la nuestra que te cruzaras en nuestros caminos.

Gracias a todos mis vecinos de pasillo, tanto del L13 como del L12, así como los nuevos compis del IRNA. Gracias a Isa, la persona más noble de todo el IBVF, a Pablo, guardián del invernadero y mejor persona, Angelita, compañera de charlas infinitas, Gloria, única y especial, Javi, es como google, todo lo sabe, “Ozemari”, con su humor especial, mi “Juarma” y ese arte que le caracteriza, Wiam, gracias por tus chimbotartas y brownies, Pedrito, ¡bendito Biorender!, Valle, mi compañera de batallas, gracias por abrirme el camino, Víctor, valiente y trabajador donde los haya, Laura, gracias por ser como eres, Belén y Paloma, corto pero intenso. Gracias también a los vecinos de edificio, Diego y Tommy, por alegrarnos las mañanas con vuestras cosas. And thanks to Jing, the best chinese girl I ever meet.

Gracias a Alicia por las infinitas horas de confocal, seguro que has tenido pesadillas buscando núcleos. Gracias Carlos por buscarme un huequito siempre en el HPLC cuando lo he necesitado, y gracias Rocío por echarme una mano con alguna que otra duda de proteómica. Gracias por la labor que hacéis en el centro.

Gracias a mis padres por darme una educación tan exquisita, por transmitirme tantos valores, y enseñarme lo verdaderamente importante. Sin vuestro empeño, dedicación y amor infinito no sería nada. Gracias por creer en mi triunfo cuando ni siquiera yo lo hacía. Sois el espejo en el que me miraré siempre. Gracias a mi “manita” que, a pesar de ser la chica, es la más grande; gracias por enseñarme tanto. Gracias a mi “cuñao”, que le falta tiempo siempre para decirme “cuñá, eres una máquina”. Gracias al resto de mi familia, tíos, primos y abuelos, así como a todos mis amigos, entre todos hacéis que sea quien soy.

Gracias a Migue, por acompañarme en esta andadura y ver siempre la luz al final del túnel. Gracias por sentirte orgulloso de mi en todo momento y verme mejor de lo que soy. Gracias por sacrificar todo por mí sin pedir nada a cambio. Gracias por enseñarme a confiar en mi misma y creer que puedo con todo.

Gracias a todas y cada una de las personas que me han acompañado durante estos cuatro años y que de una u otra forma han contribuido a que esta tesis doctoral haya sido posible. Gracias de corazón.

Lucía

ÍNDICE

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.....	13
I. INTRODUCCIÓN.....	17
1. El cianuro.....	19
1.1 Características.....	19
1.2 Producción y catabolismo.....	19
1.3 β -Cianoalanina sintasa.....	22
1.4 El cianuro como molécula señal.....	25
2. Proceso de formación del pelo radical en <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
2.1 Desarrollo del pelo radical.....	27
2.1.1 Primera etapa: diferenciación de las células de la epidermis....	27
2.1.2 Segunda etapa: inicio del pelo radical.....	28
2.1.3 Tercera etapa: elongación del pelo radical.....	28
2.2 Regulación del desarrollo del pelo radical.....	31
2.2.1 Factores endógenos.....	32
2.2.2 Hormonas.....	33
2.2.3 Disponibilidad de nutrientes.....	34
3. Respuesta inmune de <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
3.1 Resistencia basal o resistencia inducida por PAMPs (PTI).....	36
3.2 Resistencia inducida por efector (ETI).....	37
3.3 Explosión oxidativa y respuesta hipersensible.....	40
3.3.1 Producción de ROS.....	40
3.3.2 NADPH oxidasas.....	42
3.3.3 Respuesta hipersensible.....	43
3.4 Función de las hormonas en la respuesta defensiva de las plantas.....	43
3.4.1 Ácido salicílico.....	44
3.4.2 Ácido jasmónico.....	46
3.4.3 Etileno.....	48
3.5 Resistencia sistémica adquirida (SAR).....	49

II. OBJETIVOS.....	51
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
1. Material biológico.....	57
1.1 Bacterias.....	57
1.1.1. Cepas bacterianas usadas.....	57
1.1.2. Condiciones de cultivo bacteriano.....	57
1.2 Plantas.....	57
1.2.1 Líneas mutantes.....	57
1.2.2 Condiciones de crecimiento.....	58
1.2.3 Esterilización de semillas.....	59
2. Manipulación del material biológico.....	59
2.1 Manipulación de microorganismos.....	59
2.1.1. Transformación genética de bacterias.....	59
2.2 Tratamiento del material vegetal.....	60
2.2.1 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> por infiltración floral	60
2.2.2 Cruces de plantas.....	60
2.2.3 Aislamiento de mitocondrias.....	61
2.2.4 Aislamiento de protoplastos de raíces de <i>A. thaliana</i>	62
2.2.5 Citometría de flujo de células activadas por fluorescencia (FACS).....	63
2.2.6 Tinciones.....	63
2.2.6.1 Tinción NBT para la detección del anión superóxido (O_2^-).....	63
2.2.6.2 Tinción H_2DCFDA para la detección de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).....	63
2.2.6.3 Tinción Mitotracker Deep Red 633 para la detección de mitocondrias.....	64
2.3 Interacciones planta-patógeno.....	64
2.3.1 Infecciones con <i>Pseudomonas syringae</i>	64
2.3.2 Test de crecimiento bacteriano <i>in planta</i>	65
3. Ácidos nucleicos.....	65
3.1. Extracción de DNA genómico y plasmídico.....	65
3.2. Extracción de RNA y retrotranscripción.....	65

3.3.	PCR.....	66
3.4.	Limpieza de productos de PCR.....	67
3.5.	Análisis de expresión mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	67
3.6.	Secuenciación de DNA.....	69
3.7.	Electroforesis de DNA.....	69
3.8.	Obtención de construcciones génicas.....	69
4.	Proteínas.....	69
4.1.	Extracción proteica de <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
4.2.	Cuantificación de proteínas totales.....	70
4.3.	Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	70
4.4.	Inmunodetección de proteínas.....	71
4.5.	Determinación de actividades enzimáticas.....	71
4.5.1.	Ensayo de actividad β -Cianoalanina sintasa (CAS).....	71
4.5.2.	Ensayo de actividad NADPH oxidasa.....	72
4.5.3.	Ensayo de actividad guaiacol peroxidasa.....	73
4.6.	Análisis proteómico mediante espectrometría de masas.....	73
4.6.1.	Análisis proteómico mitocondrial.....	73
4.6.2.	Análisis proteómico de pelos radicales.....	75
5.	Análisis de metabolitos.....	76
5.1.	Cuantificación del contenido de cianuro.....	76
5.2.	Cuantificación del contenido de etileno liberado.....	76
5.3.	Cuantificación de ácido salicílico.....	77
5.4.	Cuantificación de los niveles de ATP.....	77
6.	Análisis estadístico.....	77
IV.	RESULTADOS.....	79
1.	Caracterización del papel regulador del cianuro en el desarrollo del radical en <i>Arabidopsis thaliana</i>	81
1.1	Estudio espacio-temporal de la expresión de la proteína CAS-C1.....	81
1.2	Caracterización de mutantes en desarrollo del pelo radical en <i>A.thaliana</i>	87

1.2.1	Análisis transcripcional de los mutantes.....	87
1.2.2	Análisis fenotípico de los mutantes de pelo radical.....	87
1.2.3	Reversión fenotípica en presencia de hidroxocobalamina.....	89
1.2.4	Análisis de expresión de genes de desarrollo de pelo radical en los dobles mutantes <i>scn1-1 cas-c1</i> y <i>rh2 cas-c1</i>	91
1.2.5	Determinación de la actividad CAS y el contenido de cianuro.....	93
1.2.6	Análisis fenotípico en presencia de ACC y determinación de los niveles de etileno.....	94
2.	Caracterizar el papel regulador del cianuro en el proceso de respuesta a la infección por patógenos.....	96
2.1	Análisis de expresión de CAS-C1-GFP en infecciones con <i>P. syringae</i>	96
2.2	Caracterización de los mutantes de respuesta a la infección por patógenos.....	98
2.2.1	Análisis transcripcional de los mutantes de respuesta a la infección por patógenos.....	98
2.2.2	Respuesta de los dobles mutantes <i>atrbohD cas-c1</i> y <i>NahG cas-c1</i> a la infección con <i>P. syringae</i>	100
2.2.3	Hipersensibilidad de <i>cas-c1</i> a SA.....	101
2.2.4	Cuantificación de los niveles de ácido salicílico.....	102
2.3	Regulación por cianuro de la proteína NPR1.....	103
2.3.1	Estudio de expresión espacio-temporal de la proteína NPR1.....	104
2.3.2	Inmunodetección de NPR1.....	107
3.	Mecanismo de acción del cianuro.....	109
3.1	Efecto del cianuro en la energía celular.....	110
3.2	Efecto del cianuro en el estado redox.....	111
3.2.1	Anión superóxido.....	111
3.2.2	Peróxido de hidrógeno.....	112
3.2.3	Actividad NADPH oxidasa.....	113
3.2.4	Actividad guaiacol peroxidasa.....	114
3.3	Modificación post-traducciona: S-cianilación.....	115
3.3.1	Análisis proteómico mitocondria.....	116
3.3.2	Análisis proteómico del pelo radical.....	122

V. DISCUSIÓN.....	129
1. Función reguladora del cianuro en el proceso de formación del pelo radical.....	131
2. Función reguladora del cianuro en el proceso de respuesta a la infección por patógenos.....	134
3. Mecanismo de acción del cianuro.....	137
VI. CONCLUSIONES.....	145
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	149

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ACC	Ácido 1-aminocyclopropano-1-carboxílico
AdoMet	S-adenosil-L-metionina
AOX	Oxidasa alternativa
APX	Ascorbato peroxidasa
ARF5	Auxin response factor 5
ATP	Adenosín trifosfato
B-CAS	β -cianoalanina sintasa
BCTV	Beet curly top virus
BSMT1	Metil transferasa 1
CAT	Catalasa
CC	Coiled-coil
CDPK	Calcium-dependent protein kinase
CERK1	Chitin elicitor receptor kinase 1
COB	Hidroxocobalamina
COI1	Coronatine insensitive1
CPC	Caprice
CTR1	Constitutive triple response 1
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DDA	Data dependent acquisition
DIA	Data independent acquisition
EBF	EIN3-binding F box protein
EDS1	Enhanced disease susceptibility 1
EIL1	EIN3-like1
EIN3	Ethylene insensitive 3
ERF1	Ethylene response factor 1
ERS1	Ethylene response sensor 1
ERU	Erulus
ETI	Effector-triggered immunity
ET	Etileno
ETC1	Enhancer of TRY and CPC1
ETS	Effector-triggered susceptibility

FLS2	Flagellin-sensing 2
GL	Glabra/Enhancer of glabra
GO	Gene ontology
GPX	Guaiacol peroxidasa
GRXC9	Glutaredoxin C9
HDAC	Histona desacetilasa
H2DCFDA	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
HR	Hypersensitive response
ICS1	Isocorismato sintasa 1
JA	Ácido jasmónico
JA-Ile	(+)-7-iso-JA-Isoleucina
JAZ	Jasmonate zim domain
KCN	Cianuro de potasio
FMO1	Flavin dependent monooxygenase 1
LC	Liquid cromatography
LRR	Leucine rich repeat
MAMP	Microbial-associated molecular patterns
MAP	Mitogen-activated protein
MeSA	Metil salicilato
MS	Mass spectrometry
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NB	Nucleotide binding
NIMIN	NPR1-interacting proteins non-inducible immunity interacting
NINJA	Novel interactor of JAZ
NIT 4	Nitrilasa 4
NO	Óxido nítrico
NPR1	Non pathogenesis-related 1
NSR1	Non-race-specific disease resistance 1
NUDT6	Nucleoside diphosphate linked X 6
OASTL	O-acetilserina(tiol)liasa
ORA59	Octadecanoid-responsive Arabidopsis AP2 59
PAD4	Phytoalexin-deficient 4
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PER/PRX	Peroxidasa

PI	Fosfatidil inositol
Pip	Ácido pipecólico
PK	Protein kinase
PLP	Cofactor piridoxal-5-fosfato
PR	Pathogenesis-related
PTI	PAMP-triggered immunity
PRR	Pattern recognition receptors
RBOH	Respiratory burst oxidase homolog
RCLK	Receptor-like cytoplasmic kinase
RHD	Root hair defective
RIN4	Rpm1-interacting protein 4
RLK	Receptor like kinase
ROP	Rho-related GTPase
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSL4	Root hair defective 6-like 4
SA	Ácido salicílico
SAG	SA O-glucoside
SAM	S-adenosil metionina
SAR	Systemic acquired resistance
SCM	Scrambled
SCN1	Supercentipede
SGE	Saliciloil-glucosa-ester
SNI1	Suppressor of npr1-inducible 1
SnRK2.8	Serine/threonine kinase SNF1-related protein kinase 2.8
SSI2	Suppressor of SA insensitivity 2
TIP1	Tip growth defective 1
TIR	Toll-interleukin-1-receptor
TIR1	Transposon inhibitor response 1
TM	Transmembrane domain

INTRODUCCIÓN

1. El cianuro

1.1 Características

El cianuro de hidrógeno es un líquido incoloro con un característico olor a almendra amarga (Donato et al., 2007). El cianuro puede encontrarse como cianuro libre (CN^- o HCN), en complejos con metales pesados o de transición (por ejemplo, complejos de metacianuros), como cianatos o tiocianatos (por ejemplo, OCN^- or SCN^- , respectivamente) o como organocianuros (por ejemplo, nitrilos) (Machingura et al., 2016). El HCN es una molécula gaseosa con un pK de 9,3 que puede disociarse en H^+ y CN^- en soluciones acuosas básicas. Dado que el pH del citosol celular es aproximadamente de 7, esta molécula se encontrará predominantemente en su estado protonado (HCN), pudiendo así difundir a través de las membranas celulares (Stannard and Horecker, 1948; Garcia et al., 2014).

La toxicidad del cianuro deriva de su capacidad de reaccionar con las cetonas o las bases de Schiff, dando lugar a cianhidrinas y derivados estables del nitrilo respectivamente, así como de quelar los iones metálicos de los grupos prostéticos de las metaloproteínas (Nagahara et al., 1999). Es un inhibidor no competitivo de la enzima citocromo c oxidasa, pues se une fuertemente al centro binuclear de la enzima oxidada (Antonini et al., 1971; Donato et al., 2007). La citocromo c oxidasa, o complejo IV, es el complejo final de la cadena de transporte de electrones y transfiere los electrones desde el citocromo c hasta el oxígeno molecular, produciendo agua y bombeando protones a través de la membrana (Cooper and Brown, 2008). En plantas, la exposición a elevadas concentraciones de cianuro causa, por tanto, inhibición del crecimiento, de la transpiración, decoloración de las hojas y en última instancia, la muerte celular (Blom et al., 2011). Existe, sin embargo, una oxidasa alternativa (AOX), que proporciona una vía alternativa al citocromo c resistente al cianuro para el transporte de electrones en la mitocondria. En esta ruta alternativa, se transportan los electrones desde el complejo I y la ubiquinona al oxígeno, evitando los complejos III y IV y disminuyendo por tanto el flujo de protones y, en último término, la síntesis de ATP (McIntosh, 1994).

1.2 Producción y catabolismo

En la naturaleza, las plantas están expuestas al cianuro producido exógena y endógenamente. Las fuentes de cianuro exógeno pueden ser:

- Antropogénicas, responsables de la mayor parte del cianuro ambiental. El hombre produce cianuro como co-producto de la química orgánica, de la síntesis de plásticos y gomas, derivados de la industria siderúrgica, extracción de metales preciosos, etc. (ATSDR, 1997).
- Pirólisis de plantas, como el caso de los incendios forestales (Johnson and Kan, 1971; Andrae and Merlet, 2001).
- Bacterias cianogénicas, como es el caso de muchas especies de *Pseudomonas* (Blom et al., 2011)
- Hongos cianogénicos, principalmente ascomicetos y basidomicetos (Knowles, 1976)
- Artrópodos cianogénicos, incluyendo varias especies de mariposas y polillas, que pueden obtener los glucósidos cianogénicos de plantas cianogénicas o bien fabricarlos *de novo* (Zagrobelny et al 2008, 2018).

Por otro lado, las plantas producen cianuro endógenamente en diversos procesos:

- Biosíntesis de la hormona etileno (Bleecker and Kende, 2000)
- Biosíntesis de camalexina (3-tiazol-2'-il-indol), una fitoalexina que se produce en *Arabidopsis thaliana* durante las infecciones por patógenos biótrosos o necrótrofos (Glawischnig 2007).
- Degradación de glucósidos cianogénicos o cianolípidos, producidos por más de tres mil especies de plantas como compuestos de defensa y de reserva de nitrógeno (Vetter, 2000)
- Metabolismo del glioxilato (Solomonson L.P, 1981)
- Metabolismo de la hidroxilamina (Hucklesby et al., 1982)

Solo las plantas que producen elevadas concentraciones de cianuro derivado de la degradación de glucósidos y lípidos cianogénicos se consideran plantas cianogénicas. En estas plantas, la acumulación de glucósidos cianogénicos no es tóxica porque las enzimas β -glucosidasas que liberan cianuro a partir de estas moléculas se encuentran separadas físicamente de ellas (Poulton, 1990). Cuando se producen daños mecánicos en la planta, como por ejemplo durante el ataque de ciertos fitopatógenos, el glucósido cianogénico y las β -glucosidasas entran en contacto y se produce la liberación de cianuro como mecanismo de defensa (Vetter, 2000). En las especies de plantas no cianogénicas, como *A. thaliana*, el cianuro se produce mayoritariamente durante la biosíntesis de etileno, fitohormona que interviene en numerosos procesos de desarrollo y de respuesta a condiciones de estrés (Bleecker and Kende, 2000).

El etileno se forma en el citosol a partir de la ruta de biosíntesis de la metionina (Fig. 1) gracias a las enzimas ACC sintasa y ACC oxidasa, que catalizan la conversión de S-adenosil-L-metionina (AdoMet) hasta el aminoácido cíclico ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y de ACC a etileno, respectivamente (Adams and Yang, 1979; Kende, 1993). La enzima ACC sintasa produce, además, 5'-metiltioadenosina, que se usa de nuevo en este ciclo para formar nueva metionina (Miyazaki and Yang, 1987). El reciclaje de metionina de este modo permite mantener una tasa alta de producción de etileno, incluso con baja disponibilidad de metionina (Bleecker and Kende, 2000).

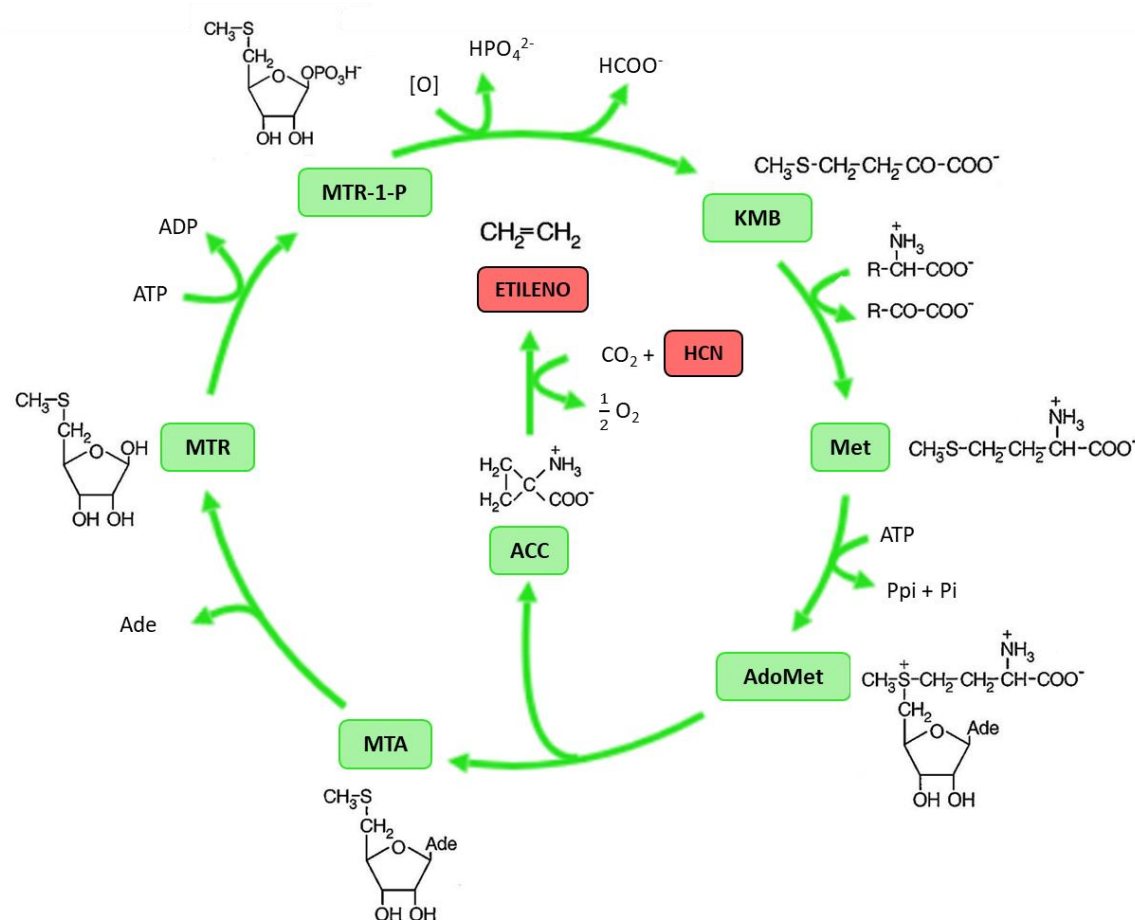
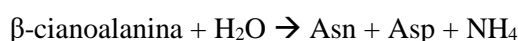
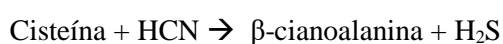


Figura 1. Ruta biosintética del etileno y ciclo de la metionina. ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; Ade, adenina; AdoMet, S-adenosil-L-metionina; KMB, ácido 2-keto-4-metil-tiobutírico; Met, L-metionina; MTA, 5'-metil tioadenosina; MTR, 5'-metiltiorribosa; MTR-1-P, 5'-metil tiorribosa-1-fosfato (Miyazaki and Yang, 1987)

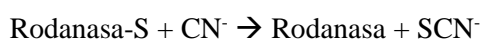
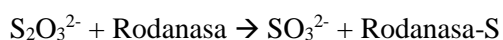
Durante la biosíntesis de etileno, el precursor ACC genera cianuro de hidrógeno, etileno, dióxido de carbono y agua (Wang et al., 2002). La toxicidad del cianuro a elevadas

concentraciones hace necesaria la existencia de un sistema de detoxificación. Las plantas poseen varias proteínas con actividades enzimáticas capaces de eliminar el cianuro:

- β -cianoalanina sintasa (β -CAS, EC 4.4.1.9), que es la actividad principal para la eliminación de cianuro en la mayoría de las plantas (Miller and Conn, 1980; Yu et al., 2012). La proteína β -CAS incorpora el cianuro a una molécula de cisteína, liberándose sulfuro de hidrógeno y dando lugar a β -cianoalanina. Posteriormente, la β -cianoalanina es convertida, a su vez, en asparagina y esta, es degradada hasta aspartato y amonio gracias a la nitrilasa NIT4 (Piotrowski et al. 2001; O'Leary et al. 2014), según las reacciones:



- la vía de las sulfotransferasas (EC 2.8.1.1), como por ejemplo la rodanasa (tiosulfato sulfurtransferasa), que incorpora el cianuro al tiosulfato dando lugar a tiocianato y sulfito (Meyer et al., 2003), según las reacciones:



- volatilización: los grupos cianuro que forman parte de diferentes compuestos químicos pasan a formas volátiles, y se liberan a la atmósfera por transpiración (Rehman et al., 2017).

1.3 β -Cianoalanina sintasa.

Las β -CAS pertenecen, junto con las O-acetilserina(tiol)liasas (OASTL), a la familia de alaninas sintasas β -sustituidas, dependientes de piridoxal fosfato (Yamaguchi et al., 2000), y se localizan en la mitocondria (Maruyama et al., 2001) y presenta dos posibles estructuras. La primera, extraída de *Lupinus perennis* es un monómero de 52 KDa, con un cofactor piridoxal-5-fosfato (PLP) (Akopyan et al., 1975); y la segunda, purificada de plantas de guisante, coliflor, espinaca y arroz, consiste en un homodímero de monómeros de 28-30 KDa con dominios estructurales α/β , (Bonner et al., 2005; Lai et al., 2009). Tanto el plegamiento de la proteína como el residuo de aminoácidos que se une al cofactor PLP están muy conservados en las enzimas OASTL de Arabidopsis y soja. Sin embargo, sutiles variaciones en los residuos que rodean al centro activo proporcionan a estas proteínas la especialización de función característica de cada una de ellas (Yi et al., 2012).

La expresión de la proteína β -CAS varía dependiendo del tejido y/o estadio de la planta (Wurtele et al., 1984, 1985), así como durante la regulación que ejerce en determinados procesos celulares. Por ejemplo, en plantas de puerro, guisante y sorgo, se detectó mediante estudios de fraccionamiento una actividad β -CAS ocho veces mayor en tejidos del mesófilo que en la epidermis (Wurtele et al., 1984). En la planta de maíz, la mayor actividad β -CAS se detectó en las células más jóvenes de la punta de la raíz (Stulen et al., 1979). Entre los procesos fisiológicos que podrían involucrar a la β -CAS, se encuentran la respuesta ante estreses abióticos o bióticos y la elongación de la raíz y del pelo radical. De hecho, la expresión de la proteína β -CAS, así como los niveles de cianuro, aumentan en plantas de tabaco frente a un estrés por sequía (Liang, 2003). Se ha demostrado además que elevados niveles de cianuro en la raíz de *Arabidopsis* provoca defectos en la formación de los pelos radicales (García et al., 2010), suprime la síntesis de auxinas en la punta de la raíz e inhibe el crecimiento de la raíz primaria (Rudrappa et al., 2008), lo cual sugiere que la β -CAS podría regular estos procesos de desarrollo. De igual manera, la privación de nutrientes (Takahashi and Saito, 1996), las hormonas (Meyer et al., 2003; Lai et al., 2009) o el pH (Yamaguchi et al., 2000), son otros factores que también regulan la expresión de estas proteínas.

La actividad β -CAS es asimismo responsable de la asimilación del cianuro liberado del metabolismo de los glucósidos cianogénicos. Este cianuro es convertido, en última instancia, en aminoácidos por la proteína NIT4. Así, la β -CAS estaría contribuyendo al papel de los glucósidos en el metabolismo del nitrógeno y los aminoácidos (Picmanova et al., 2015).

En la planta no cianogénica *A. thaliana*, la actividad β -CAS mayoritaria en la eliminación de cianuro es llevada a cabo por la proteína mitocondrial CAS-C1 (CAS; EC 4.4.1.9). En *Arabidopsis*, la familia de proteínas estructuralmente homólogas a las OASTL está compuesta por nueve isoformas, que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Familia OASTL en *A. thaliana* (Garcia et al., 2015)

PROTEÍNA	LOCUS	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	REFERENCIA
Atcys-C1	At3g61440	Mitocondria	(Garcia et al., 2010)
Atcys-D1	At3g04940	Citosol	(Jost et al., 2000)
Atcys-D2	At5g28020	Citosol	(Jost et al., 2000)
CS26	At3g03630	Plastos	(Bermudez et al., 2010)
DES1	At5g28030	Citosol	(Alvarez et al., 2010)
OAS-A1	At4g14880	Citosol	(Barroso et al., 1995)
OAS-A2	At3g22460	Ninguna (pseudogén)	(Jost et al., 2000)
OAS-B	At2g43750	Plastos	(Heeg et al., 2008)
OAS-C	At3g59760	Mitocondria	(Alvarez et al., 2012)

Como se describió en el apartado anterior, en la mitocondria, la proteína CAS-C1 cataliza la incorporación de cianuro a la molécula de cisteína generando sulfuro de hidrógeno y β -cianoalanina, que es transportada al citosol para posteriormente ser convertida en asparagina, aspartato y amonio gracias a la actividad nitrilasa NIT4 (Piotrowski et al., 2001; O'Leary et al., 2014). La actividad CAS-C1 también contribuye al metabolismo del sulfuro ya que, en la reacción se produce sulfuro de hidrógeno que es utilizado por la OASTL mitocodrial OAS-C para la síntesis de cisteína, cerrando así el ciclo de la cisteína en la mitocondria (Hatzfeld et al., 2000).

Las mutaciones en el gen *CAS-C1* conducen a una acumulación de cianuro endógeno que, aun no siendo tóxico para la planta, provoca defectos en el desarrollo de los pelos radicales, sugiriendo un papel señalizador del cianuro en el desarrollo de la raíz (Garcia et al., 2010). Este fenotipo se fenocopia por adición de cianuro exógeno al medio de crecimiento, y es revertido por la adición de hidroxocobalamina, molécula utilizada como antídoto en las intoxicaciones por cianuro (Borron et al., 2007; Hall et al., 2007). Además, el mutante *cas-c1* presenta una mayor susceptibilidad al hongo necrótrofo *Botrytis cinerea* y una mayor resistencia a la bacteria hemibiótrofa *P. syringae*, así como al virus de la remolacha BCTV. La expresión de *CAS-C1* se induce durante interacciones compatibles de *Arabidopsis* con cepas de *P. syringae* pv. *tomato DC 3000* pero se reprime en interacciones incompatibles con *P. syringae* pv. *tomato DC 3000 avrRpm1*, permitiendo así la acumulación de cianuro. Así pues, además de regular el

desarrollo del pelo radical, el cianuro podría tener un papel señalizador en la repuesta de *Arabidopsis* a la infección por patógenos (Garcia et al., 2013).

1.4 El cianuro como molécula señal

En términos generales, la función del cianuro se ha asociado tradicionalmente a mecanismos de defensa debido a su elevada toxicidad, tal como queda reflejado en la función de los glucósidos cianogénicos detallada anteriormente. Sin embargo, en los últimos años se ha propuesto un cambio de concepto, de una molécula exclusivamente tóxica a una molécula con un papel señalizador en diversos procesos fisiológicos (Gotor et al., 2017). El cianuro comparte características comunes con otros compuestos englobados en el grupo de los gasotransmisores, como el óxido nítrico (NO) o el sulfuro de hidrógeno (H_2S) (Tabla 2). Los gasotransmisores son moléculas gaseosas de pequeño tamaño, con moderada o alta reactividad química, que pueden disolverse en agua a determinados pH y alcanzar diferentes compartimentos celulares. Estas moléculas presentan una dualidad entre su toxicidad y su papel señalizador ya que, a elevadas concentraciones deben ser eliminadas debido a su toxicidad pero, a bajas concentraciones, tienen un papel señalizador ampliamente demostrado y aceptado (Delledonne et al., 1998; Gupta et al., 2011; Gotor et al., 2017; Aroca et al., 2018).

Tabla 2. Características de los gasotransmisores

	Sulfuro de hidrógeno	Cianuro de hidrógeno	Óxido nítrico
Fórmula química	H-S-H	$\text{HC}\equiv\text{N}$	$\text{N}=\text{O}$
Masa molecular (g mol^{-1})	34.08	27.03	30.01
Reactividad química	Muy alta	Moderada	Muy alta
Tóxico/Señalizador	Sí/Sí	Sí/Sí	Sí/Sí

Existen cada vez más evidencias de que el cianuro podría actuar como molécula señal en diferentes organismos y diversos procesos fisiológicos. En bacterias, además del papel antagonista del cianuro, se ha descrito un papel regulador para esta molécula. Concretamente,

constituye un factor de virulencia que interviene en la patogenicidad y la virulencia de la bacteria oportunista *Pseudomonas aeruginosa* (Zdor, 2015; Chowdhury and Bagchi, 2017). El cianuro y los glucósidos cianogénicos pueden actuar también como feromonas durante la reproducción de algunas especies de mariposas y polillas (Zagrobely et al., 2007; Zagrobely et al., 2018). En mamíferos, el cianuro de hidrógeno puede generarse en los fagocitos durante la fagocitosis (Stelmaszynska, 1986) y en células cerebrales tras estimulación con opiáceos, donde activa receptores del estímulo nervioso y es necesario para la acción analgésica de compuestos opioides (Gunasekar et al., 2000; Gunasekar et al., 2004). Por todo esto, algunos autores consideran al cianuro como neuromodulador (Borowitz et al., 1997).

Se ha demostrado que el cianuro elimina la dormición de las semillas de diversas especies vegetales y favorece su germinación (Corbineau et al., 2008). Además, la adición de cianuro exógeno protege a plantas de tabaco y de *Arabidopsis* del ataque de virus independientemente de la inducción de proteínas PR y de la ruta de NPR1 y de un modo dependiente de la oxidasa alternativa (Chivasa and Carr, 1998; Ono et al., 2001); también protege a plantas de arroz frente al ataque de hongos (Iwai et al., 2006; Seo et al., 2011). Estos datos, junto con la implicación del cianuro producido endógenamente en el desarrollo de los pelos radicales y la respuesta inmune en *Arabidopsis* anteriormente descrita, sugieren que el cianuro es una molécula señal. Los mecanismos subyacentes a esta señalización son objeto de estudio de esta tesis doctoral.

2. Proceso de formación del pelo radical en *Arabidopsis thaliana*

El desarrollo de la raíz fue uno de los eventos evolutivos más importantes en la adaptación de las primeras plantas al ecosistema terrestre. Las plantas vasculares desarrollaron los pelos radicales, unas estructuras tubulares especializadas de las células de la epidermis que favorecen la incorporación de nutrientes y el anclaje de la planta al suelo, y juegan un papel muy importante en la interacción con otros organismos (Cui et al., 2018). En *Arabidopsis*, los pelos radicales presentan un diámetro medio de 10 μm y crecen muy rápido longitudinalmente, más de 1 $\mu\text{m}/\text{min}$, llegando a alcanzar una longitud de 1 mm o más (Grierson et al., 2014).

2.1 Desarrollo del pelo radical

2.1.1 Primera etapa: diferenciación de las células de la epidermis

Las células de la epidermis presentan una distribución específica que determinan su destino celular: aquellas que se encuentran entre dos células corticales se convertirán en pelos radicales y se denominan células H (*Hair cell*), y aquellas células en contacto con la membrana de una única célula cortical desarrollarán células N (*Non hair cell*), de manera que las filas de células H y células N en la raíz se alternan (Datta et al., 2011). Esta distribución específica está determinada durante el desarrollo embrionario de la raíz, antes incluso de la formación del pelo radical (Grierson et al., 2014; Cui et al., 2018).

La diferenciación de células N o H está dirigida por una serie de proteínas reguladoras que se detallan en la figura 2. En las células N, las proteínas WER (*Werewolf*), TTG (*Transparent testa glabra*) y GL3/EGL3 (*Glabra3/Enhancer of glabra3*) actúan en un complejo transcripcional tripartito que regula positivamente la expresión del factor de transcripción GL2 (*Glabra2*), que a su vez inhibe al factor de transcripción RHD6 (*Root hair defective 6*) y determina el desarrollo de la célula N (Grierson et al., 2014). En las células H, CPC (*Caprice*) compite con WER por la unión a GL3/EGL3 en el complejo transcripcional, inhibiéndolo. Esta proteína es capaz de actuar como molécula señal, translocándose a las células vecinas para inhibir la formación de células N (Kang et al., 2013). Las proteínas TRY (*Triptychon*) y ETC1 (*Enhancer of TRY and CPC1*) son redundantes con CPC y por lo tanto inhiben también la actividad del complejo transcripcional (Wang et al., 2010). SCM (*Scrambled*) es un receptor LRR-RLK (*leucine-rich-repeat receptor-like kinase*) que permite a las células epidérmicas percibir su posición celular relativa (Kwak et al., 2005), de modo que se inhibe en las células N por el complejo TTG/GL3/WER y se expresa en las células H (Kwak and Schiefelbein, 2008), donde inhibe a WER. Según este modelo, en las células N precursoras se acumulan altos niveles de la proteína WER, que permite que el complejo transcripcional esté activo, la proteína GL2 se exprese, y las células se diferencien a células N. Sin embargo, en las células H precursoras se acumula CPC, que provoca la inactivación del complejo transcripcional, la represión de GL2, y la activación de los genes de diferenciación de pelos radicales (Fig. 2).

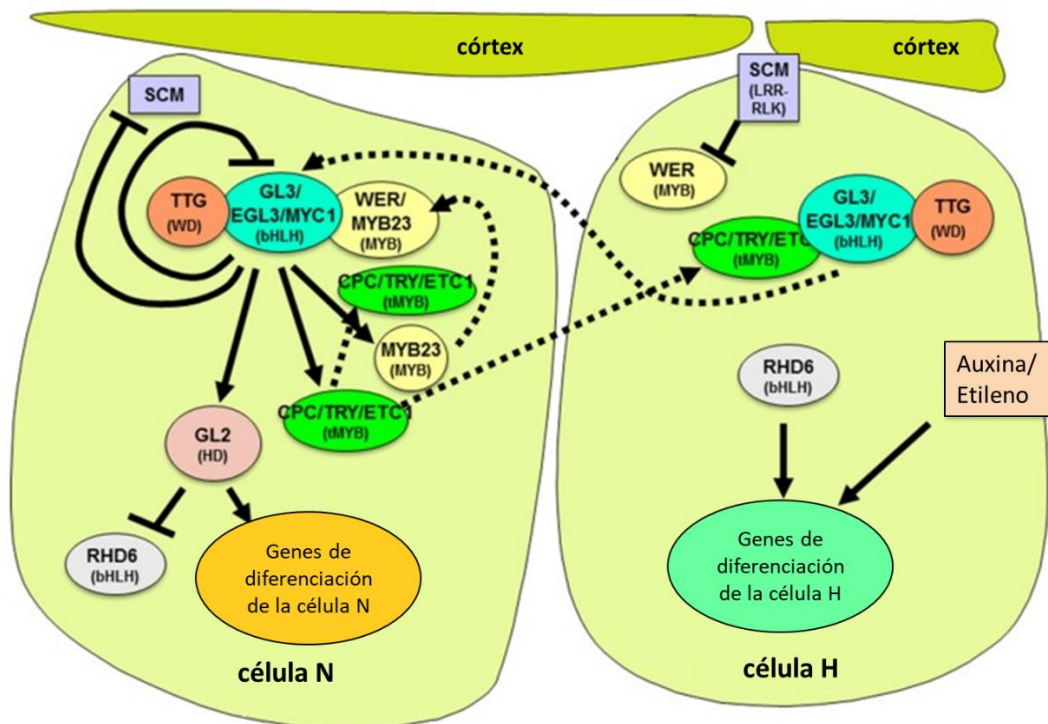


Figura 2. Diferenciación de las células de la epidermis de la raíz de *A. thaliana* (Grierson et al., 2014).

2.1.2 Segunda etapa: inicio del pelo radical

En la etapa del comienzo del pelo radical (Fig. 3a), las células vegetales cambian su forma modificando la pared celular. La expansión celular de la célula H se inicia en una zona de la pared externa de aproximadamente 22 μm de ancho. Las proteínas ROP (“RHO-RELATED GTPase”) son reclutadas por el receptor quinasa FER (*Feronia*) (Duan et al., 2010) y se concentran en esta zona de crecimiento (Molendijk et al., 2001); de igual forma se concentra retículo endoplásmico y actina filamentosa. Además, el pH disminuye hasta 4-4.5, activando las expansinas y permitiendo la relajación de la pared celular y la formación de la protuberancia inicial (Monshausen et al., 2007).

2.1.3 Tercera etapa: elongación del pelo radical

Una vez desarrollada la protuberancia inicial, comienza el crecimiento dirigido del pelo radical (Fig. 3b). En la punta del pelo radical en crecimiento, las vesículas producidas por el retículo endoplásmico rugoso y el complejo de Golgi liberan mediante exocitosis polisacáridos y

glicoproteínas de la pared celular, así como proteínas sintasas y transportadores de membrana (Ketelaar et al., 2008). El control del tráfico de membranas, por tanto, es esencial en el desarrollo del pelo radical. Las proteínas Rab GTPasas juegan un papel muy importante en la regulación del tráfico vesicular (Nielsen et al., 2008). RAB-A4b (*Rab GTPase Homolog A4b*) recluta las quinasas PI4K β 1 (*Phosphatidylinositol 4-OH Kinase β 1*) y PI4K β 2 (*Phosphatidylinositol 4-OH Kinase β 2*), que junto con la fosfatasa RHD4 (*Root hair defective 4*) controlan el estado de fosforilación del fosfatidil inositol (PI)-PI4P. Este PI-4P tiene un papel clave en la regulación y transporte de la carga secretora hacia la punta del pelo radical (Thole et al., 2008), pues recluta proteínas con dominios de unión a PI-4P involucradas en estos procesos (Bubb et al., 1998; Yoo et al., 2012).

Al igual que en la etapa de iniciación, las ROP GTPasas también participan en la elongación del pelo radical. ROP2 (*Rho-related protein from plants2*) inicia la producción de ROS por parte de la NADPH oxidasa RHD2/atrbhD (*Root hair defective 2*) (Foreman et al., 2003; Jones et al., 2007). Las ROS activan la entrada de Ca^{2+} que, a su vez, activa a RHD2, en un ciclo de retroalimentación positiva (Mendrinna and Persson, 2015). La producción de ROS está inducida, además, por la proteína RSL4 (*Root hair defective 6 like 4*), que controla la expresión de las NADPH oxidasas C y J, así como de las peroxidasas apoplásticas de clase III, que también participan en la producción de ROS en el pelo radical (Hwang et al., 2017). Este gradiente de Ca^{2+} en la punta del pelo radical dirige la dirección de crecimiento, facilita la fusión de las vesículas con la membrana plasmática apical y contribuye a la liberación del contenido vesicular necesario para la expansión de la pared celular (Pei et al., 2012). Además del Ca^{2+} , son importantes otros iones como el K^+ y el Cl^- , que son acumulados activamente en la célula para mantener su turgencia durante el crecimiento (R. Lew, 1998).

La organización del citoesqueleto es también esencial en la formación y desarrollo del pelo radical. El gradiente de Ca^{2+} parece tener una función dual en la organización del citoesqueleto, pues por un lado favorece la acumulación de F-actina en la punta del pelo radical (Ketelaar, 2013) y por otro evita la polimerización de los microtúbulos en esa misma zona (Sieberer et al., 2005). Mutaciones en los genes que codifican las proteínas reguladoras de los microfilamentos de actina y/o los microtúbulos provocan defectos en el crecimiento del pelo radical, tales como diferencias en su longitud, ramificaciones, ondas o protuberancias, entre otros.

La pared celular del pelo radical en desarrollo está compuesta por celulosa, xiloglucanos y pectinas, además de otras proteínas estructurales minoritarias como expansinas (Bruex et al., 2012), o glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Mohnen and Tierney, 2011). Las microfibrillas de celulosa se depositan inicialmente en el extremo del pelo en crecimiento, y posteriormente se desarrolla una segunda capa dispuesta longitudinalmente en la célula (Akkerman et al., 2012). Son muchas las proteínas reguladoras de la pared celular que intervienen en el desarrollo del pelo radical, como KOJAK, una proteína similar a las celulosa sintasas, que se localiza en el retículo endoplásmico y participa en la síntesis de polisacáridos no celulósicos de la pared celular (Favery et al., 2001); o las xiloglucan endotransglicosilasas (XET), que rompen y reensamblan el xiloglucano durante el crecimiento apical del pelo (Nishitani and Tominaga, 1992).

Las auxinas, suministradas por las células N hasta las células H, son responsables del mantenimiento del crecimiento del pelo radical. Cuando el pelo radical se elonga y va aumentando su longitud, la señal de auxinas se va perdiendo progresivamente hasta que cesa por completo, momento en el que finaliza el crecimiento del pelo radical (Jones et al., 2009).

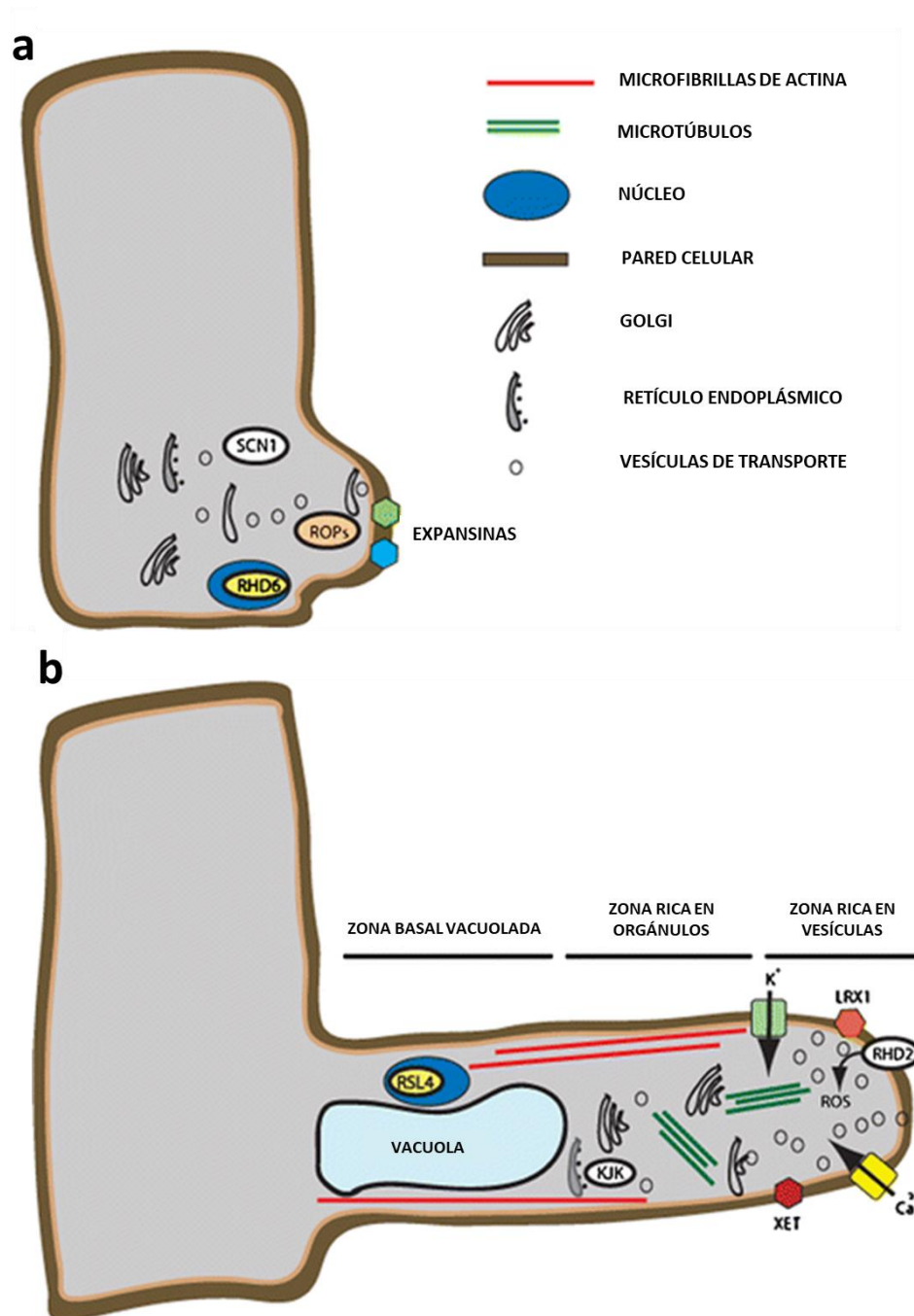


Figura 3. Desarrollo del pelo radical de *Arabidopsis thaliana* (Datta et al., 2011). a) inicio del pelo radical b) elongación del pelo radical

2.2 Regulación del desarrollo del pelo radical

Son muchos los factores que regulan el desarrollo del pelo radical, bien endógenos o bien ambientales como las hormonas o la disponibilidad de nutrientes. Estos factores controlan la longitud, cantidad y forma del pelo radical.

2.2.1 Factores endógenos

Existen genes que regulan la cantidad de protuberancias que se desarrollan en un mismo pelo, como *TRH1* (*Tiny root hair 1*) o *SCN1* (*Supercentipede 1*). El gen *SCN1* codifica un regulador negativo de las Rho-GTPasas (ROPs) (Carol et al., 2005), que se acumulan específicamente en la base de la protuberancia inicial del pelo radical y regulan la actividad de una NADPH oxidasa (Grierson and Schiefelbein, 2009), codificada por el gen *RHD2*, responsable de la generación de ROS y calcio en la punta del pelo radical y que son indispensables para su correcta elongación (Foreman et al. 2003; Jones et al. 2007; Ishida et al. 2008). Además de genes que controlan el número de protuberancias en el pelo radical, encontramos genes que regulan su tamaño, como *TIP1* (*Tip growth defective 1*) y *RHD1* (*Root hair defective 1*), que restringen el área donde la pared celular se degrada para permitir el desarrollo del pelo (Parker et al., 2000). Por otro lado, existen genes que regulan etapas más tardías de la formación del pelo radical, como la elongación. Entre estos genes se encuentran *RHD2*, *SHV1* (*SHAVEN1*), *SHV2/MRH4/COBL9*, *SHV3/MRH5* y *TRH1*.

RHD6 controla varias etapas del crecimiento del pelo radical, tanto el inicio del crecimiento como el número de protuberancias y la posición donde estas se desarrollan (Masucci and Schiefelbein, 1994; Yi et al., 2010; Grierson et al., 2014). *RHD6* regula positivamente la transcripción de *RSL4*, que se acumula en el pelo radical en elongación y determina su tamaño (Honkanen and Dolan, 2016). *RSL4* es un factor de transcripción bHLH necesario y suficiente para el crecimiento de los pelos radicales que interviene tanto en la etapa de diferenciación de las células de la epidermis y la elongación del pelo radical como en la regulación del desarrollo de los pelos radicales por hormonas y por disponibilidad de nutrientes (ver más adelante). Esta proteína puede auto-activarse, controlando su propia expresión, y es degradada por el proteasoma (Datta et al., 2015). *RSL4* controla la expresión de infinidad de genes involucrados en el crecimiento del pelo radical, desde genes relacionados con la remodelación y síntesis de pared celular, genes metabólicos o señalizadores celulares, hasta genes que controlan la homeostasis de ROS (Won et al., 2009). Esto convierte a *RSL4* en un regulador clave del proceso de desarrollo del pelo radical, pues integra señales hormonales, metabólicas y de desarrollo (Marzol et al., 2017).

2.2.2 Hormonas

Las hormonas etileno, auxinas, JA, estrigolactonas y citoquininas son reguladores positivos del crecimiento del pelo radical, mientras que los brasinoesteroides y el ácido abscísico funcionan como represores (Cui et al., 2018). De entre todas ellas, las auxinas y el etileno son las hormonas clave en la regulación del desarrollo del pelo radical, pues regulan diferentes aspectos de este, bien sea sinérgicamente o de forma independiente. Así pues, la sobreexpresión de los receptores de auxinas como TIR1 (*Transposon inhibitor response 1*) o los tratamientos con ACC (precursor del etileno), potencian la elongación del pelo radical, mientras que mutaciones en los receptores de auxinas o el uso de inhibidores de la síntesis y/o señalización del etileno la reprimen (Cho and Cosgrove, 2002; Dharmasiri et al., 2005). Además de la elongación del pelo radical, el ACC induce la formación de pelos radicales ectópicos de una forma independiente de la regulación transcripcional por el complejo WER-GL3/EGL3-TTG1 (Masucci and Schiefelbein, 1996), lo que indica que el etileno puede actuar aguas abajo o independientemente de la ruta de desarrollo del pelo radical endógena anteriormente descrita. Como se indica en la figura 4, el etileno induce la elongación del pelo radical de varias formas, controlando los niveles de auxinas o a través de EIN3, que se une físicamente a RHD6, que a su vez activa a RSL4 (Feng et al., 2017). La inducción de la elongación del pelo radical mediada por RSL4 es compartida también por las auxinas (Yi et al., 2010; Zemlyanskaya et al., 2018) a través del factor de respuesta a auxinas ARF5 (*Auxin response factor 5*) (Mangano et al., 2017). Además, las auxinas controlan la elongación del pelo radical por una vía diferente, en la que se incluye el regulador específico de pared celular de pelos radicales ERU (*Erulus*), así como ARF7 y ARF19 (Schoenaers et al., 2018) (Fig. 4). Las auxinas también controlan la localización de las ROP y, por tanto, el lugar de inicio del pelo radical (Payne and Grierson 2009). Por último, se ha demostrado que el NO es necesario para la remodelación de la pared celular durante la formación del pelo radical, y que este proceso es dependiente de auxinas. Estas inducen la producción de NO en el pelo radical, que regula transcripcional, post-transcripcional y epigenéticamente la expresión de multitud de genes involucrados en el desarrollo del pelo radical (Moro et al., 2017).

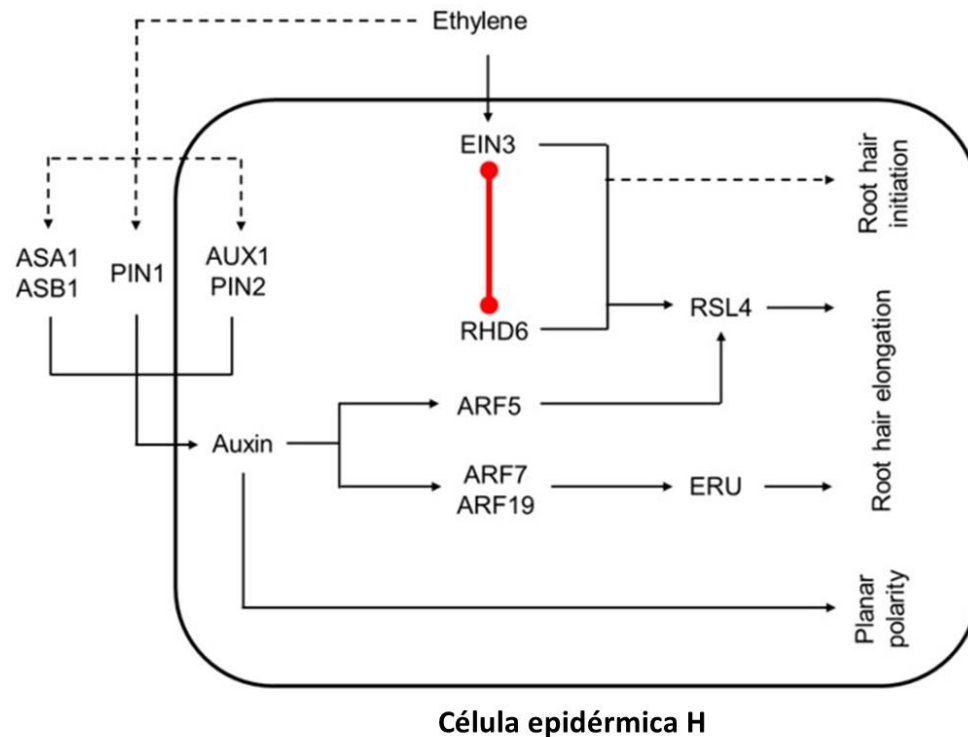


Figura 4. Papel del etileno y las auxinas en la regulación del desarrollo del pelo radical (Zemlyanskaya et al., 2018).

2.2.3 Disponibilidad de nutrientes

El desarrollo del pelo radical está también regulado por la concentración de nutrientes en el medio. En medios con baja disponibilidad de nutrientes, las plantas inducen la longitud y densidad de pelos radicales para incrementar la absorción de los nutrientes escasos (Jungk, 2001). Por ejemplo, la densidad y longitud de los pelos radicales en la raíz de una planta silvestre cultivada en un medio con baja concentración de fosfato son cinco y tres veces mayores, respectivamente, que en raíces cultivadas en un medio rico en fosfato (Savage et al., 2013). El aumento de longitud de los pelos radicales en limitación de fosfato es dependiente de *RSL4* (Yi et al., 2010; Datta et al., 2015). Recientemente se ha demostrado, por otra parte, que elevadas concentraciones de nitratos en el medio de crecimiento aumentan la densidad de pelos radicales en *Arabidopsis* de una forma dependiente de los factores de transcripción *TGA1*, *TGA4* y *CPC* (Canales et al., 2017). Por tanto, la respuesta de la planta a la falta de nutrientes depende de la especie, el estadio del desarrollo y las condiciones ambientales.

Algunos datos indican que el etileno juega un papel importante en la inducción del desarrollo de los pelos radicales inducida por falta de nutrientes. Se ha observado un aumento en los

niveles de etileno y de ACC en plantas cultivadas en medios con bajas concentraciones de Fe, K y P (Borch et al., 1999; Romera et al., 1999; Jung et al., 2009; García et al., 2011), así como una inhibición del crecimiento de los pelos radicales tras la adición de inhibidores de la señalización de etileno en medios deficientes en Boro (González-Fontes et al., 2015). No obstante, el papel exacto del etileno en la respuesta de algunos nutrientes como el P no está claro todavía y necesita un análisis más profundo.

3. Respuesta inmune de *A. thaliana*

Las plantas están sometidas continuamente al ataque de patógenos, ya sean bacterias, virus, hongos o invertebrados. Por ello, poseen unos sistemas de defensa muy efectivos que hacen que la probabilidad de que el patógeno termine provocando enfermedad en la planta sea muy baja. Las plantas poseen sistemas de defensa constitutivos (o preformados) e inducibles. Las defensas constitutivas de la planta pueden ser estructurales, que impiden la entrada de los patógenos al interior de la planta, como los tricomas, la cutícula o los estomas, o químicas, grupo en el que se incluyen las enzimas hidrolíticas y metabolitos secundarios de defensa como las saponinas o los glucosinolatos. Las defensas inducibles de la planta incluyen la resistencia basal o PTI (*PAMP-triggered immunity*), la respuesta inducida por efector o ETI (*effector triggered immunity*), la respuesta hipersensible y la resistencia sistémica adquirida (SAR, *systemic acquired resistance*), todas ellas detalladas en los siguientes apartados.

Cada patógeno ha desarrollado una forma específica para invadir la planta. Según su estrategia de ataque y las características de la interacción planta-patógeno que desarrollan podemos clasificarlos en tres grupos: patógenos necrótrofos, que secretan toxinas o atacan la pared celular enzimáticamente y matan a las células durante la infección, patógenos biótrofos, que establecen un contacto íntimo con las células de la planta y las mantienen vivas durante la infección, y patógenos hemibiótrofos, que establecen una fase inicial biótrofa que precede a una fase final necrótrofa en la que las células terminan muriendo. La mayoría de los hongos biótrofos desarrollan haustorios, que son estructuras especializadas que les permiten atravesar la rígida pared celular y producir invaginaciones de la membrana plasmática de la célula vegetal en contacto con la membrana plasmática del hongo. De este modo, se aumenta considerablemente la superficie de contacto entre el hongo y la planta y se optimiza el flujo de nutrientes y agua desde la célula vegetal al hongo (Buchanan et al., 2000).

Cuando las condiciones ambientales son favorables, las defensas preexistentes de la planta son inadecuadas y la planta falla en detectar al patógeno o no activa la respuesta inducible de forma eficaz, se produce una interacción planta-patógeno compatible, en la que el patógeno consigue producir enfermedad en la planta. Por el contrario, si la planta consigue detener de algún modo el avance del patógeno, se produce una interacción incompatible.

3.1 Resistencia basal o resistencia inducida por PAMPs (PTI)

Las plantas son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP/MAMP, *pathogen/microbial-associated molecular patterns*). Los PAMP pueden ser por ejemplo β -glucanos y quitina en hongos o lipopolisacáridos y flagelina en bacterias. Estos PAMP son percibidos por receptores transmembrana (PRR, *pattern recognition receptors*) que transmiten la señal al citosol a través de cascadas de señalización dependientes de proteínas quinasas, como las MAP (*mitogen-activated protein*) quinasas (Asai et al., 2002) o las CDPK (*calcium-dependent protein kinase*), que fosforilan a la NADPH oxidasa, H⁺ATPasas, y factores de transcripción. Esto desencadena en la planta una respuesta basal denominada resistencia inducida por PAMP (PTI, *PAMP-triggered immunity*) (Fig. 5) (Tsuda and Katagiri, 2010; Miller et al., 2017; Zhang et al., 2018).

Los receptores PRRs más caracterizados son los RLK (*receptor-like kinase*), que son receptores quinasa que contienen un dominio con repeticiones ricas en leucina (LRR). Se han descrito más de 600 RLKs en Arabidopsis, muchos de los cuales están implicados en la respuesta inmune de la planta. En Arabidopsis, el sistema PTI más estudiado es el desencadenado por el péptido N-terminal conservado de 22 aminoácidos (flg22) de la proteína bacteriana flagelina, que es reconocida por el RLK FLS2 (*flagellin-sensing 2*). La unión de flg22 a FLS2 cambia la conformación de FLS2, de manera que se asocia a otro RLK, BAK1 (brassinosteroid insensitive 1-associated kinase 1), para activar la PTI (Chinchilla et al., 2007). La proteína BAK1 no tiene un papel directo en la percepción del PAMP pero se ha demostrado que es capaz de asociarse a receptores PRR, incluido el receptor FLS2, formando un complejo que se fosforila a los pocos segundos de la unión PAMP-receptor PRR (Schulze et al., 2010).

La quitina producida por la pared celular del hongo es reconocida por el receptor CERK1 (*chitin elicitor receptor kinase 1*), otro receptor RLK que se asocia con el receptor quinasa citoplasmático (RCLK, *receptor-like cytoplasmic kinase*) PBL27. PBL27 fosforila a MAPKKK 5 (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5*), activando la cascada de MAP

quinasas en Arabidopsis (Yamada et al., 2016). Aunque la naturaleza de los PAMP puede ser muy variada, todos desencadenan una respuesta PTI similar (Miller et al., 2017). Los análisis transcriptómicos revelan que diferentes PAMP activan los mismos grupos de genes y que estos genes son también activados durante la ETI. Parece, por tanto, que las plantas disponen de una maquinaria de señalización común ante estímulos diferentes (Tsuda and Katagiri, 2010).

Por último, las plantas pueden también reconocer patrones moleculares asociados a daño (DAMP, *damage-associated molecular patterns*) a través de PRR, como los oligogalacturonidos desprendidos de la pared celular de la planta ante el ataque de la poligalacturonasa de hongos (Ridley et al., 2001). Los DAMP inducen la PTI de igual forma que los PAMP (Choi and Klessig, 2016)

La figura 5 sintetiza los procesos involucrados en la respuesta basal o PTI.

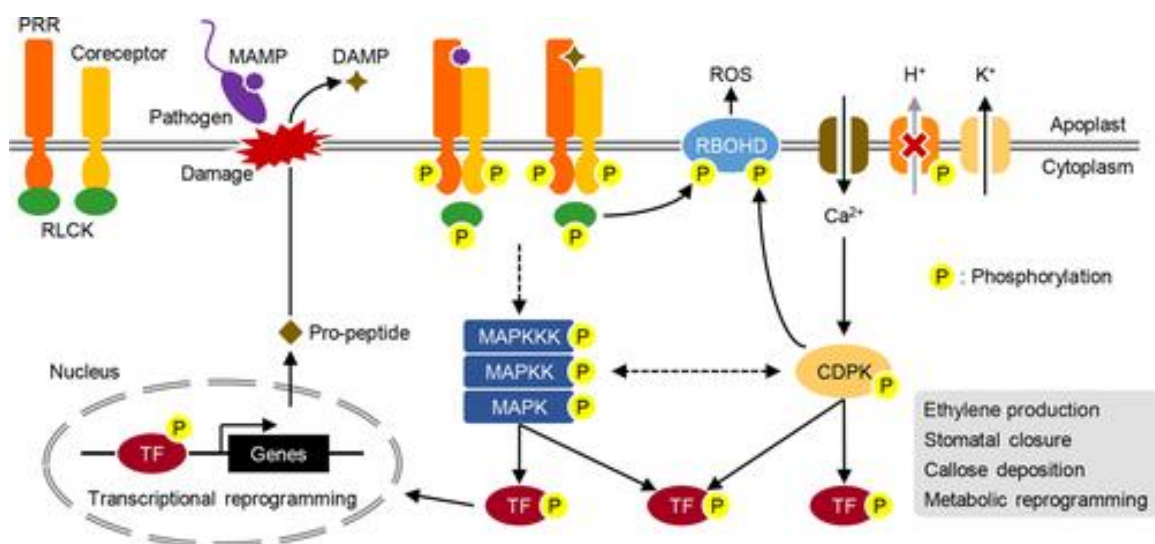


Figura 5. Resistencia basal o resistencia inducida por PAMP (PTI) (Saijo et al., 2018)

3.2 Resistencia inducida por efector (ETI)

Para evitar el reconocimiento del patógeno por parte de la planta, estos han desarrollado durante la evolución un mecanismo mediante el cual inyectan al espacio intracelular de la planta, gracias a un sistema de secreción tipo III, proteínas efectoras capaces de interferir en la señalización de la respuesta inmune, suprimiendo la resistencia PTI y potenciando la infección. Es lo que se denomina susceptibilidad inducida por efector (ETS, effector-triggered susceptibility) (Gohre and Robatzek, 2008). Estos patógenos son virulentos y las proteínas

efectoras son denominadas factores de virulencia. A su vez, las plantas han desarrollado mecanismos específicos de defensa basados en los genes de resistencia R (*resistance genes*). Estos genes codifican receptores, generalmente citoplasmáticos, que reconocen específicamente a los efectores patogénicos, desencadenando una respuesta de defensa muy rápida y eficaz denominada resistencia inducida por efector (ETI, *effector-triggered immunity*) (Jones and Dangl, 2006) (Fig. 6).

Existen multitud de familias de genes R, con una arquitectura compleja que combina dominios de unión a nucleótidos (NB, *nucleotide binding*), dominios ricos en repeticiones de leucina (LRR, *leucine rich repeat*), dominios de proteínas quinasas (PK, *protein kinase*), dominios de hélice superenrollada (CC, *coiled coil*), dominios transmembrana (TM, *transmembrane domain*), dominios de lectina (B-lectin, *bulb-type mannose specific binding lectin domain*), dominios de proteínas WRKY y dominios TIR (*Toll-interleukin-1-receptor*). La mayoría de receptores combinan dominios NB y LRR, y pueden agruparse en dos tipos: receptores TIR-NB-LRR y receptores (CC)-NB-LRR (Kapos et al., 2019). Parece que el dominio TIR de los receptores TIR-NB-LRR es el que confiere la capacidad de señalización aguas abajo, ya que su sobreexpresión es suficiente para disparar la respuesta hipersensible (Swiderski et al., 2009). Sin embargo, esto no ocurre al sobreexpresar dominios CC de los receptores CC-NB-LRR (Rairdan et al., 2008).

Una de las interacciones receptor-proteína efectora mejor estudiada es Rpm1-AvrRpm1. La proteína efectora AvrRpm1 de *P. syringae* se une e induce la fosforilación del regulador negativo RIN4 (*Rpm1-interacting protein 4*), que activa al receptor NB-LRR Rpm1 e induce la ETI (Grant et al., 1995). Se ha demostrado que RIN4 interacciona con las H⁺-ATPasas potenciando la apertura estomática y facilitando el paso del patógeno (Dodds and Rathjen, 2010). Las cepas de *Pseudomonas* que expresan *AvrRpm1* provocan en la planta, además de la PTI, una respuesta hipersensible y una activación de la ETI.

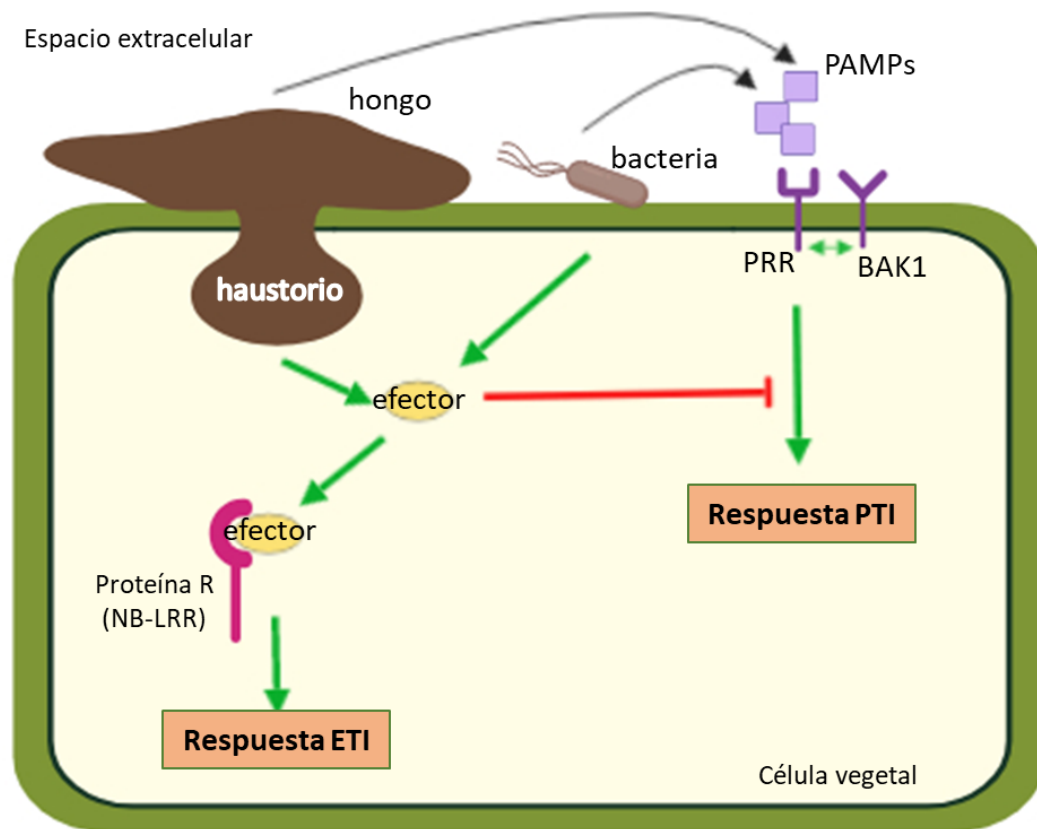


Figura 6. Sistema inmune en plantas. Los patógenos liberan los PAMPs al espacio extracelular y estos son reconocidos por los receptores PRR de la superficie celular, activando la PTI. Muchos receptores PRR interaccionan con la proteína BAK1 para iniciar la PTI. Los patógenos, para suprimir la PTI, liberan proteínas efectoras en la célula del hospedador a través de un sistema de secreción tipo III (bacterias) o a través del haustorio (hongos). Estas proteínas efectoras son reconocidas por las proteínas R, generalmente receptores tipo NB-LRR, que desencadenan la ETI. (adaptado de (Dodds and Rathjen, 2010)).

La ETI se caracteriza por desencadenar una explosión oxidativa muy potente tras varias horas de la infección por el patógeno, así como una inducción de muerte celular localizada en la zona de infección del patógeno, llamada respuesta hipersensible (HR), que limita el avance del patógeno. A diferencia de lo que ocurre en la PTI, en la ETI existe una especificidad muy alta entre la planta y el microorganismo hospedador.

En la Tabla 3 se resumen las características específicas de las respuestas PTI y ETI.

Tabla 3. Características diferenciales en PTI y ETI

PTI	ETI
Respuesta inmediata (minutos)	Respuesta tardía (horas)
Inducida por PAMPs	Inducida por efectores (Avr)
Receptores en la superficie celular	Receptores intracelulares o unidos a membrana
Una única explosión oxidativa	Explosión oxidativa dividida en dos fases
No específica (generalmente)	Muy específica
No induce HR	Induce HR

3.3 Explosión oxidativa y respuesta hipersensible

La percepción del ataque de un patógeno desencadena en la planta una serie de respuestas encaminadas a detener su progresión. Para ello, activa una cascada de señalización mediada por calcio y MAP kinasas (MAPK) y se produce una explosión oxidativa, una reprogramación de la expresión génica, deposición de callosa en los sitios de infección y eventualmente la activación de la respuesta hipersensible. La mayoría de las respuestas de defensa se activan en los dos mecanismos de resistencia, PTI y ETI, antes descritos, aunque sus cinéticas temporales son diferentes (Tao et al., 2003).

3.3.1 Producción de ROS

Una de las primeras respuestas celulares tras el reconocimiento del patógeno es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS incluyen al oxígeno singlete (O_2), el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo (OH^\cdot). Entre ellos, el más estable es el H_2O_2 , pues presenta una vida media mayor y actúa inter e intracelularmente para desencadenar la cascada de respuestas de defensa (Camejo et al., 2016).

La producción de ROS durante la interacción planta-patógeno es bifásica y se produce en el apoplasto. En primer lugar, a los pocos minutos del reconocimiento del patógeno, se produce una explosión oxidativa inicial, transitoria e inespecífica que es común a la PTI y la ETI. El

reconocimiento de una proteína efectora por parte de una proteína R durante la ETI desencadena horas después del ataque del patógeno la segunda etapa de producción de ROS, más intensa y prolongada, a la que acompaña una acumulación de óxido nítrico (NO) y ácido salicílico (SA), para luego desencadenar la respuesta hipersensible (HR) (Heath, 2000). Ambas fases de explosión oxidativa ocurren como consecuencia de un flujo de calcio hacia el interior celular. El Ca^{2+} no solo funciona como un inductor de la explosión oxidativa, sino que también actúa como una molécula señal aguas abajo de dicha explosión (Asai y Yoshioka, 2008).

Son muchas las funciones defensivas de la producción de ROS durante la interacción planta-patógeno:

- Efecto directo sobre el patógeno. Las especies más reactivas, como los radicales hidroxilo, pueden matar directamente al patógeno (Chen and Schopfer, 1999). Además, generan derivados lipídicos por oxigenación no enzimática que dañan las membranas celulares (Montillet et al., 2005)
- Contribuyen al establecimiento de barreras físicas en el lugar de interacción del patógeno con la planta, por entrecruzamiento de las glicoproteínas de la pared celular (Bradley et al., 1992) o de los precursores de la lignina y la suberina (Hückelhoven, 2007).
- Son responsables del control redox de la activación de genes de defensa (Kotchoni and Gachomo, 2006), bien sea directamente a través de factores de transcripción o indirectamente por activación de cascadas de fosforilación (Kovtun et al., 2000).
- Controlan, junto con el SA, la regulación redox de NPR1 (Mou et al., 2003) y el establecimiento de la SAR (Zhang et al., 2018).
- Regulan la HR.
- Generan fitoalexinas y otros metabolitos secundarios que limitan el crecimiento del patógeno (Thoma et al., 2003).
- Modulan el tráfico vesicular para el transporte de la señal ROS o para la endocitosis de receptores específicos, bien sea para la activación de la defensa o para su reciclaje (Torres, 2010).
- Inducen el cierre estomático independientemente del ABA, impidiendo la penetración de los patógenos a través de estas aberturas (Qi et al., 2017).

Aunque las ROS regulan positivamente las respuestas de defensa de la planta frente a patógenos biótrosos, los patógenos necrótrofos pueden inducir la producción de ROS para el beneficio propio (Torres et al., 2006; Camejo et al., 2016).

Además de la producción de ROS en el apoplasto, la planta produce ROS de manera natural en el interior de la célula en la respiración mitocondrial (Vidal et al., 2007), en la fotosíntesis cloroplastídica (Yaeno et al., 2004) y en el peroxisoma como resultado de varias rutas oxidativas (reacción de la glicolato oxidasa, oxidación de los ácidos grasos, etc) (Camejo et al., 2016). Las enzimas que hacen frente a la acumulación de ROS intracelular, junto con los antioxidantes ascorbato o glutatión, son las superóxido dismutasas (SOD), las catalasas (CAT1 y 2), ascorbato peroxidasas (APX) y la oxidasa alternativa mitocondrial (AOX). La modulación de estas enzimas permite la acumulación de ROS necesaria para la activación de las defensas ante el ataque de un patógeno y la posterior HR (Dat et al., 2003).

3.3.2 NADPH oxidasas

La producción de las ROS en el apoplasto se debe principalmente a las NADPH oxidasas ATRBOHD (*respiratory burst oxidase homolog D*) y ATRBOHF (Torres et al., 2006; Chaouch et al., 2012). Estas enzimas pertenecen a la familia RBOH, que en *Arabidopsis* consta de diez miembros. Las NADPH oxidasas transfieren los electrones desde el NADPH citosólico al oxígeno apoplástico para formar O_2^- que es luego convertido a H_2O_2 por las superóxido dismutasas (Suzuki et al., 2011). Las proteínas ATRBOH presentan varios dominios transmembrana que determinan su localización en la membrana plasmática, una extensión N-terminal intracelular que contiene el dominio de fosforilación y el de unión a Ca^{2+} (*EF-hand*) y una extensión C-terminal intracelular que une el FAD y el NAD(P)H. Tras el reconocimiento del patógeno, se activa la entrada de calcio extracelular que se une a las ATRBOH (Ogasawara et al., 2008). La acumulación de calcio intracelular activa a proteínas quinasas dependientes de calcio (CPKs) como la CPK5 que activa a ATRBOHD mediante fosforilación en la extensión N-terminal (Dubiella et al., 2013). Por otra parte, BIK1 fosforila a ATRBOHD independientemente del calcio. Se cree que la fosforilación por BIK1 es muy rápida y prepara a ATRBOHD para su posterior regulación por el calcio y las CPKs. La entrada de calcio en la célula es por lo tanto necesaria para activar las proteínas ATRBOH y desencadenar la producción de ROS.

Por último, se ha descrito que las proteínas ATRBOH pueden ser reguladas también mediante otros mecanismos, como las proteínas G, que participan en la regulación de la producción de ROS inducida por FLG22 (Liang et al., 2016).

3.3.3 Respuesta hipersensible

La HR causa una muerte rápida de las células infectadas por un patógeno biótrofo para detener el avance del patógeno, así como una activación de los sistemas de defensa de las células adyacentes (SAR, *systemic acquired resistance*). Los mecanismos que desencadenan la HR son diferentes según el tipo de interacción planta-patógeno. En la mayoría de los casos, las ROS apoplásticas actúan como reguladores positivos de la HR; sin embargo, dependiendo del sistema, hay casos en los que las ROS contribuyen negativamente al control de la muerte celular (Belhaj et al., 2009). Además de la explosión oxidativa apoplástica, los niveles de ROS en los diferentes compartimentos subcelulares juegan un papel muy importante en la HR (Torres, 2010), bien sea directamente por su toxicidad o indirectamente por la producción de señales que promueven la muerte celular. Las ROS producidas en el cloroplasto son indispensables para que se produzca la HR (Zurbriggen et al., 2009), al igual que las ROS mitocondriales. Esta explosión oxidativa es necesaria pero no suficiente para desencadenar la HR; además, es necesaria una acumulación de SA y NO (Vlot et al., 2009; Terron-Camero et al., 2018).

3.4 Función de las hormonas en la respuesta de defensa de las plantas

Las rutas dependientes de las hormonas ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) son importantes reguladores de la expresión génica de defensa. El SA interviene en la respuesta a patógenos biótrofos y el JA-ET en la respuesta a patógenos necrótrofos e invertebrados. Tradicionalmente, estas rutas se han considerado antagonistas pero existen numerosas evidencias que han puesto de manifiesto interacciones cooperativas o sinérgicas entre ellas (Mur et al., 2006; Bari and Jones, 2009; Wawrzynska et al., 2010; Buxdorf et al., 2013).

3.4.1 Ácido salicílico (SA)

Durante la biosíntesis de SA, el precursor corismato puede convertirse en SA a través de dos vías enzimáticas: la de la fenil alanina amonio sintasa (PAL) y la de la isocorismato sintasa 1 (ICS1), siendo esta última más importante en respuesta a estrés (Zhang et al., 2018). La mayor parte del SA es convertido a SAG (SA O-glucoside) por acción de glucosil transferasas, para luego ser transportado y almacenado en las vacuolas. Una pequeña cantidad se transforma en saliciloil-glucosa-ester (SGE) y metil salicilato (MeSA) (Vlot et al., 2009). Este último es una forma inactiva pero actúa como molécula señal en largas distancias en la SAR (Park et al., 2007).

Tras reconocer a las proteínas diana, las diferentes proteínas R estimulan la biosíntesis de SA a través de diferentes proteínas reguladoras. Mientras que los receptores TIR-NB-LRR promueven la síntesis de SA a través de las proteínas EDS1 (*enhanced disease susceptibility 1*) y PAD4 (*phytoalexin-deficient 4*), los receptores CC-NB-LRR lo hacen a través de NDR1 (*non-race-specific disease resistance 1*) (Dodds and Rathjen, 2010). EDS1 y PAD4 son cruciales para la acumulación de SA y el desarrollo de la SAR (Gruner et al., 2013), y controlan el alcance de la respuesta hipersensible y muerte celular en torno al foco de infección (Feys et al., 2001; Wiermer et al., 2005; Wirthmueller et al., 2007). Además, inhiben a MYC32, regulador clave de la ruta del JA, para así reforzar la respuesta dependiente de SA (Cui et al., 2018).

La proteína NPR1 es un regulador clave en la ruta de señalización dependiente de SA (Cao et al., 1997). La expresión de más del 98% de las proteínas de esta ruta depende de NPR1 (Wang et al., 2006). Además, es necesaria para la completa activación de la PTI y la ETI y especialmente para la activación de la HR (Zhang et al., 2018). Esta proteína contiene una secuencia de localización nuclear y dos dominios de interacción proteína-proteína. En condiciones basales, NPR1 se encuentra en forma oligomérica en el citoplasma celular gracias a la presencia de puentes disulfuro intermoleculares. Los cambios en el estado redox celular producidos por el SA en respuesta a una infección provocan la monomerización de NPR1 a través de las tiorredoxinas TRX-H3 y TRX-H5 (Tada et al., 2008). La fosforilación de la serina 589 de NPR1 por la kinasa SnRK2.8 (*serine/threonine kinase SNF1-related protein kinase 2.8*) de manera independiente de la acumulación de SA es necesaria para su localización nuclear y la consiguiente activación de la respuesta dependiente de SA. Tras su fosforilación y monomerización, NPR1 es transportada al núcleo a través de los poros nucleares (Lee et al.,

2015). En el núcleo, NPR1 interacciona con los factores de transcripción TGA, que inducen la expresión de genes de defensa como por ejemplo los genes *PR* (*pathogenesis related*) (Fu and Dong, 2013). Se ha demostrado que la sumoilación de NPR1 por SUMO3 en respuesta a SA cambia la especificidad de la unión de NPR1 con el represor WRKY70 al inductor TGA3, activando de este modo la expresión de *PR-1* (Saleh et al., 2015).

El papel de los parálogos de NPR1, NPR3 y NPR4 aún presenta controversia. Algunos estudios afirman que NPR3 y NPR4 son receptores de SA que inducen la degradación de NPR1 de una forma dependiente de la concentración de SA, permitiendo así el progreso de la ETI y la muerte celular programada (Rate and Greenberg, 2001). Según estos estudios, a elevadas concentraciones de SA, NPR3 y NPR1 interaccionan y NPR1 se degrada vía proteasoma para evitar una sobreacumulación. Por el contrario, a bajas concentraciones de SA, la unión NPR1-NPR4 se inhibe para mantener niveles basales de NPR1 (Fu et al., 2012). A favor de esta hipótesis, recientemente se ha demostrado que NPR3 y NPR4 degradan las proteínas JAZ, que son represoras de la ruta del JA, activando así la respuesta a JA (Liu et al., 2016). Sin embargo, otros estudios más recientes muestran que NPR3 y NPR4 son represores transcripcionales que interaccionan con los factores de transcripción TGA para modular la expresión de los genes de defensa (Ding et al., 2018). Otro parálogo de NPR1, NPR2, también interviene en la percepción de la señal de SA de igual forma que NPR1 (Castelló et al., 2018). Además, NPR1 es un regulador esencial en la represión de la respuesta de JA (Spoel et al., 2003). Su localización nuclear es necesaria para la expresión de represores de la ruta de JA, como GRX480 (glutaredoxina 480) o factores de transcripción TGA o WRKY.

Son muchas las proteínas reguladoras de la ruta de respuesta a la infección por patógenos dependiente de SA. En el grupo de proteínas reguladoras dependientes de NPR1 encontramos a los inductores NUDT6 (*Nucleoside diphosphate linked X 6*) (Ishikawa et al., 2010) y WRKY 50-51 (Gao et al., 2011) y al represor WRKY33 (Birkenbihl et al., 2012), mientras que en el grupo de proteínas que ejercen su acción reguladora independientemente de NPR1 y dependiente de la familia WHY, se encuentra el regulador positivo GRXC9 (*glutaredoxin C9*) y los represores NIMIN1,2 y 3 (*NPR1-interacting proteins non-inducible immunity 1-interacting 1*), SNI1 (*suppressor of npr1-inducible 1*) y SSI2 (*suppressor of SA insensitivity 2*). Las diferentes rutas de señalización dependientes de SA están esquematizadas en la figura 7.

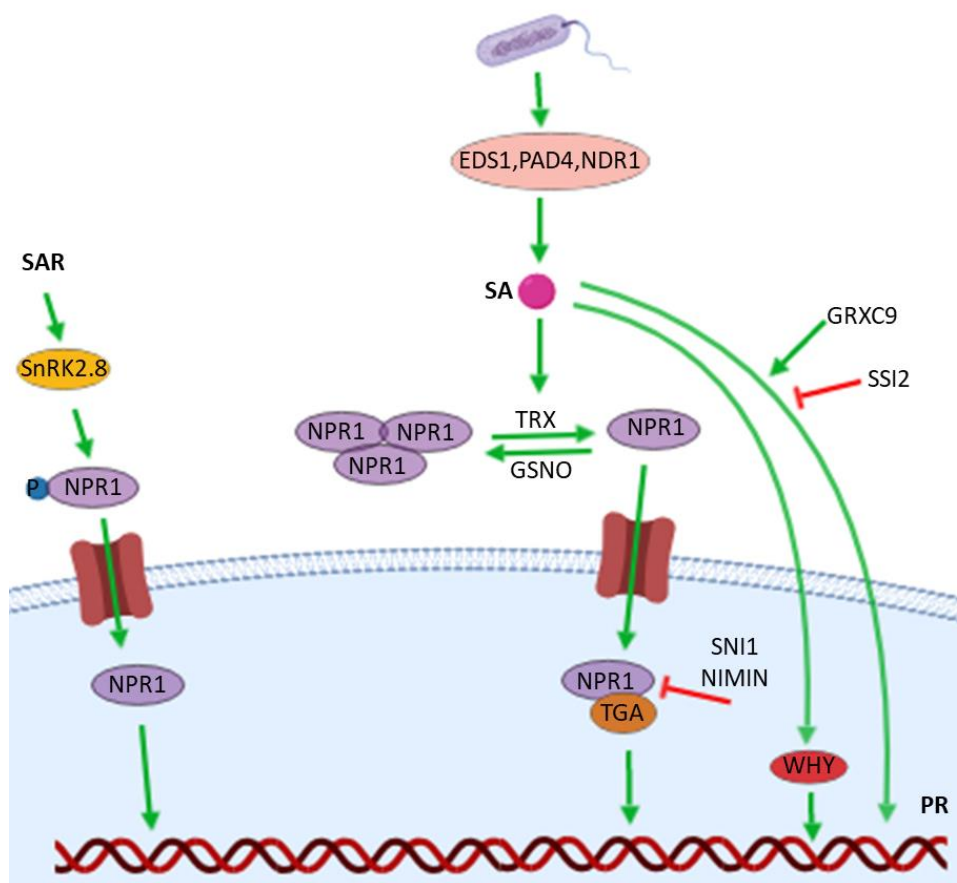


Figura 7. Ruta de defensa dependiente de SA (adaptado de (Zhang et al., 2018)).

3.4.2 Ácido jasmónico (JA)

El JA es un compuesto derivado de lípidos que se sintetiza a través de la ruta de biosíntesis de las oxilipinas. Las enzimas claves de esta ruta son 13-LOX (*13-lipoxygenase*), 13-AOS (*13-allene oxide synthase*), AOC (*allene oxide cyclase*) y OPR3 (*OPDA-specific reductase*). La biosíntesis de JA se inicia a partir del ácido α -linolénico, que es liberado de las membranas lipídicas de los cloroplastos como respuesta a ciertos cambios en el ambiente, como estreses abióticos o bióticos (León and Sánchez-Serrano, 1999; Reymond et al., 2000; Wasternack, 2007; Zhang et al., 2018).

Como muestra la figura 8, ante un estrés, las plantas acumulan diferentes formas de JAs, originando en último término y gracias a la acción de JAR1 (*jasmonate resistant 1*) el compuesto bioactivo (+)-7-iso-JA-Ile (JA-Ile), resultado de la unión del JA con la isoleucina (Zhang et al., 2018). JA-Ile se une a COI1 (*coronatine insensitive1*), que forma parte del complejo E3 ligasa SCF^{COI1} (*S phase kinase-associated protein 1 (SKP1)-Cullin-F-box*),

cambiando su conformación y permitiendo su unión a las proteínas represoras JAZ (*jasmonate zim domain*). El complejo E3 ligasa SCF^{COI1} degrada a las proteínas JAZs, que son represores de factores de transcripción tales como MYC32, el activador central de la transcripción de los genes de respuesta a JA. Las proteínas JAZ, además, reclutan a otros represores, como TPL (*Topless*), que se une a ellas a través de la proteína NINJA (*novel interactor of JAZ*). Se ha demostrado que TPL inhibe la transcripción de genes de defensa, bien interaccionando con las histonas desacetilasas (HDAC) en los promotores génicos o bien interrumpiendo el complejo mediador de la RNA polimerasa II (Kazan and Manners, 2012).

La ruta de respuesta a patógenos dependiente de JA se bifurca en dos ramas a partir de las proteínas JAZ: la ruta MYC, responsable de la respuesta ante heridas, y la ruta ERF, asociada al ataque de patógenos necrótrofos. Curiosamente, estas dos rutas son antagonistas entre sí, ya que la mutación o supresión de proteínas de la ruta MYC produce plantas más resistentes al ataque de patógenos necrótrofos, y la sobreexpresión de proteínas de la ruta ERF en plantas de *Arabidopsis*, como por ejemplo ORA59, las hace más atractivas a las larvas de *Pieris rapae* (Verhage et al., 2011). Los factores de transcripción MYC activan la expresión de genes involucrados en la respuesta de defensa mediada por JA, como *VSP2*, que es un gen marcador de la ruta, o *MED25*, una subunidad del complejo de la transcripción “Mediador” (*Mediator*) (Chen et al., 2012). Mientras que MYC2 es el factor de transcripción principal de la ruta de JA, MYC3 y MYC4 son activadores adicionales a MYC2 (Fernandez-Calvo et al., 2011). MYC2 regula además a ANAC109 y ANAC055, factores de transcripción con dominios NAC que reprimen la expresión de proteínas de la rama ERF. En la ruta ERF intervienen las proteínas ERF1 (*ethylene response factor 1*) y ORA59 (*octadecanoid-responsive Arabidopsis AP2 59*), que controlan a PDF1.2, una proteína regulada también por ET en la ruta de respuesta a patógenos necrótrofos.

Aunque el efecto represor de la ruta del SA sobre la del JA se ha estudiado en profundidad, la información sobre la influencia del JA en la ruta del SA es aún muy limitada. Se sabe, por ejemplo, que ANAC019, ANAC055 y ANAC072 son factores de transcripción que activan la transcripción de la metil transferasa 1 (BSMT1), transformando el SA en su forma inactiva SA-éster. Las interacciones de antagonismo entre las rutas de JA y SA son aprovechadas por algunos patógenos como *P. syringae*, que produce una toxina, la coronatina, que mimetiza al JA-Ile (Geng et al., 2014) y de este modo favorece su virulencia, ya que al activar la ruta del JA se produce una inhibición de la ruta del SA (Geng et al., 2014).

Recientemente se ha encontrado que EIN3 (*ethylene insensitive 3*) y EIL1 (*EIN3-like1*) son dos factores de transcripción que actúan aguas arriba de ERF1 y ORA59 y que conectan las rutas del JA y del ET, haciendo que estas actúen sinérgicamente (Zhu et al., 2011).

3.4.3 Etileno (ET)

El etileno es una hormona vegetal gaseosa que desempeña un papel esencial en muchos procesos fisiológicos como la maduración de los frutos o la abscisión foliar. Al igual que el cianuro, se sintetiza a partir de la S-adenosil metionina (SAM) en el ciclo de Yang, donde el precursor ACC (*1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid*) es convertido por la ACC oxidasa hasta ET, HCN, CO₂ y H₂O.

Existen 5 receptores de respuesta a etileno, que se localizan en el retículo endoplasmático y se dividen en dos grupos: por un lado ETR1 (*ethylene response 1*) y ERS1 (*ethylene response sensor 1*), con actividad histidina quinasa, y por otro ETR2, ERS2 y EIN4, con actividad serina/treonina quinasa (Moussatche and Klee, 2004). Estos receptores necesitan unir previamente un ión de cobre para la correcta asociación con el ET. En condiciones basales, los receptores no se encuentran unidos al ET sino que activan a CTR1 (*constitutive triple response 1*), que inhibe a EIN2 mediante fosforilación (Santner and Estelle, 2009). EIN2 es un regulador esencial de la ruta, que estabiliza a EIN3 y EIL1 evitando su degradación por EBF1 (*EIN3-binding F box protein 1*) y EBF2 en el proteasoma (Zhu et al., 2011). Ante un estrés, el etileno se une a sus receptores, CTR1 se inhibe, activándose entonces EIN2, que entra en el núcleo (Wen et al., 2012). Hay estudios que proponen una interacción directa de EIN2 con los receptores de ET, dando lugar a una respuesta independiente de CTR1 (Bisson and Groth, 2010, 2015). Una vez en el núcleo, EIN2 favorece la acumulación del factor de transcripción EIN3. EIN3 forma un homo-dímero con su homólogo EIL1 e induce la expresión de genes tempranos de respuesta a etileno entre los que se encuentra ERF1 (Ju and Chang, 2015), que activa la expresión de los genes tardíos de respuesta al etileno (Berrocal-Lobo et al., 2002; Kendrick y Chang, 2008; Yoo y Sheen, 2008) (Fig. 8).

La señalización de las rutas del ET y la rama ERF del JA convergen en las proteínas EIN3 y EIL1, siendo idénticas a partir de estos factores de transcripción, tal como se ha descrito anteriormente en el apartado del JA (Zhang et al., 2018). En la figura 8 se esquematiza la respuesta dependiente de JA y ET y las relaciones entre ambas.

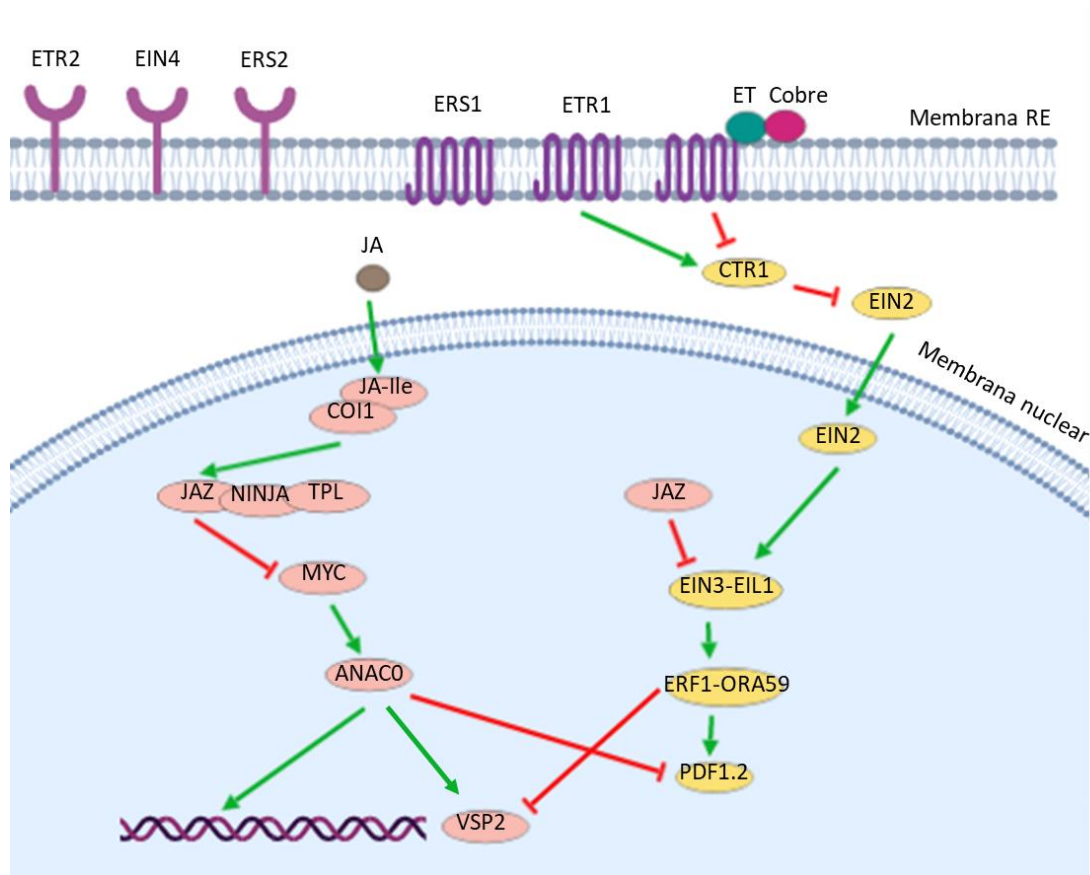


Figura 8. Ruta de defensa dependiente de JA-ET (adaptado de (Zhang et al., 2018)).

3.5 Resistencia sistémica adquirida (SAR)

La SAR es una resistencia de amplio espectro que tiene lugar en las plantas tras una primera infección. Se caracteriza por restringir el crecimiento del patógeno, suprimir el desarrollo de los síntomas de la enfermedad y proteger a la planta de la infección por otros patógenos. Los patógenos que activan la ETI y dan lugar a la respuesta hipersensible son potentes inductores de la SAR (Durrant y Dong, 2004), aunque la PTI puede también dispararla (Mishina y Zeier, 2006; Tsuda et al., 2008). Algunos estudios demuestran que algunos MAMPs pueden inducir la SAR, así como la necrosis tisular causada en el sitio de inoculación por bacterias virulentas o avirulentas (Mishina and Zeier, 2007).

La respuesta SAR se asocia a una reprogramación transcripcional masiva, dependiente de NPR1, que incluye la activación de los genes *PR* y dependiente de los factores de transcripción TGAs (Pieterse and Van Loon, 2004). Gracias a ella, las plantas son capaces de responder al ataque de fitopatógenos semanas e incluso meses tras la primera infección. Esta respuesta se

caracteriza por su efectividad a largo plazo y su efecto transgeneracional, debido a modificaciones epigenéticas (Luna et al., 2012). Se ha demostrado que la savia de un floema de una planta que tiene la SAR inducida y, por lo tanto, contiene las señales móviles de la SAR, es efectiva ante la infección de otra planta por otro patógeno distinto. Así pues, la SAR no es específica ni de la planta ni del patógeno que infecta (Adam et al., 2018).

La resistencia sistémica adquirida necesita una señal móvil que transmita la respuesta a otras partes de la planta. La SAR se acompaña de un incremento local y sistémico de los niveles endógenos de SA, y la aplicación exógena de SA o de sus análogos funcionales induce la SAR y activa a los genes PR, pero el descubrimiento de una síntesis *de novo* de SA en el tejido sistémico puso en entredicho que el SA fuese la señal móvil de la SAR (Rasmussen et al., 1991). Aunque es necesaria una investigación en profundidad sobre la transmisión de la señal de la SAR, se han identificado varios compuestos muy diferentes químicamente, capaces de transmitir esta señal, como el MeSA, ácido azelaico (AzA), glicerol-3-fosfato (G3P), el diterpenoide dehidroabietinal (DA), la *lipid transfer protein* DIR1 (*defective in induced resistance 1*), o el ácido N-hidroxi-pipecólico (NHP), derivado del catabolito de la lisina ácido pipecólico (Pip), entre otros (Adam et al., 2018).

Por último, la luz juega un importante papel en la defensa de la planta, especialmente en la SAR. La intensidad y tiempo de exposición a la luz regula no solo la efectividad de la SAR, sino también la acción de los diferentes compuestos señalizadores (Adam et al., 2018). Por ejemplo, bajo altas intensidades de luz, la SAR puede desarrollarse sin necesidad de acumulación de SA ni proteínas PR, pero necesita la contribución de la proteína FMO1 (*flavin dependent monooxygenase 1*), que cataliza la conversión de Pip a NHP (Chen et al., 2018). Por el contrario, en oscuridad, el desarrollo de la SAR se encuentra comprometido (Zeier et al., 2004; Griebel and Zeier, 2008; Liu et al., 2011)

OBJETIVOS

Resultados previos del grupo de investigación sugieren que la molécula de cianuro, de bajo peso molecular y alta reactividad química, podría actuar como molécula señal en plantas, al igual que los gasotransmisores óxido nítrico y sulfuro de hidrógeno (Gupta et al., 2011; Li and Lancaster, 2013; Aroca et al., 2018) . Nuestra hipótesis sostiene que la proteína CAS-C1 es esencial para mantener concentraciones no tóxicas de cianuro en la mitocondria y permitir así su papel señalizador (Garcia et al., 2014). El objetivo fundamental de esta tesis doctoral es demostrar el papel señalizador del cianuro en dos procesos fundamentales de la planta *Arabidopsis thaliana*, así como comprender su mecanismo de acción. Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización del papel señalizador de la molécula de cianuro en el desarrollo de los pelos radicales de *A. thaliana*.
2. Caracterización del papel señalizador de la molécula de cianuro en el proceso de respuesta a la infección por patógenos en *A. thaliana*.
3. Determinación de los mecanismos de acción del cianuro.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1. Bacterias

1.1.1. Cepas bacterianas utilizadas

Para este trabajo se han utilizado células competentes de *Escherichia coli*, estirpe DH5 α , proporcionadas por el Servicio de Cultivos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis.

Además, se utilizaron células de *E. coli*, estirpe DB3.1, para la propagación de plásmidos destino del kit de clonaje Gateway (Invitrogen), así como células “One Shot TOP 10” incluidas en este mismo kit.

Para la transformación mediante infiltración floral se usaron células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe C58/pMp90, proporcionadas por el Servicio de Cultivos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis.

Para las infecciones se utilizó *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000), y esta misma cepa *Pst DC*, transformada con un plásmido que contiene el gen de avirulencia *avrRpm1* (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRpm1*, *Pst* DC3000 *avrRpm1*) (Grant et al., 1995).

1.1.2. Condiciones de cultivo bacteriano

Las cepas bacterianas se cultivaron en medio LB, que contiene triptona (10 g l⁻¹), extracto de levadura (5 g l⁻¹), NaCl (10 g l⁻¹) y agar (15 g l⁻¹). Este medio se suplementó con los antibióticos necesarios en cada caso.

1.2. Plantas

1.2.1. Líneas mutantes

Para el desarrollo de esta tesis se han utilizado plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia, procedentes del European Arabidopsis Stock Centre (NASC, University of Nottingham, UK).

Además, se han usado una serie de mutantes insercionales de T-DNA procedentes de las colecciones SALK (Salk Institute Genome Analysis Laboratory) y GABI-kat (German Plant

Genome Research Program), así como mutantes cedidos por grupos de investigación (Tabla 4).

Tabla 4. Líneas mutantes y transgénicas utilizadas en esta tesis

NOMBRE	LOCUS	MUTACIÓN	REFERENCIA
<i>cas-cl</i>	At3g71440	Inserción T-DNA	(Garcia et al., 2010)
<i>rhd2-1</i>	At5g51060	Cambio de base (STOP prematuro)	(Foreman et al., 2003)
<i>rhd2GK</i>	At5g51060	Inserción T-DNA	
<i>scn1-1</i>	At3g07880	Cambio de base (STOP prematuro)	(Carol et al., 2005)
<i>atrbohD3</i>	At5g47910	Inserción de un transposón	(Torres et al., 2002)
<i>ein2-1</i>	At5g03280	Cambio de base (STOP prematuro)	(Alonso et al., 1999)
NahG	At5g33340	Ganancia de función	(Lawton et al., 1995)

1.2.2. Condiciones de crecimiento

Las plantas se cultivaron en cámaras de cultivo (Aralab) en ciclo largo (fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad) o ciclo corto (fotoperiodo de 8 h luz / 16 h oscuridad), manteniendo constante la temperatura (20 °C luz / 18 °C oscuridad), la humedad relativa (70 %) y la intensidad lumínica (120-140 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Las plantas se cultivaron en sustrato vegetal, y se regaron con agua o abono líquido (COMPO) en los casos en que este fue necesario.

Para el cultivo *in vitro* de plantas se utilizaron placas de Petri con medio sólido MS (Murashige and Skoog, 1962), pH 5,6-5,8. En el caso del mutante *rhd2*, el pH del medio se ajustó a 4 ya que este mutante presenta un fenotipo más pronunciado a pHs ácidos (Monshausen et al., 2007). En los casos en que fueron necesarios, este medio se suplementó con sacarosa (medio MSS) y/o antibióticos a las concentraciones apropiadas.

Para los cultivos hidropónicos, las semillas se esterilizaron como se describe en el apartado 1.2.3, se vernalizaron durante 4 días a 4 °C y germinaron 7 días en lana de roca húmeda. Posteriormente las plántulas se traspasaron a las cajas de cultivo hidropónico que contenían 5

l de solución nutritiva. Esta solución nutritiva se cambió dos veces cada mes. Los cultivos hidropónicos crecieron en ciclo corto durante 90 días.

La composición de los medios utilizados fueron los siguientes:

Medio MS: 2.2 g l⁻¹ de mezcla basal MS (Murashige and Skoog, Duchefa), agar 0,8 % (p/v) o phytigel 3,5 % (p/v), pH 5,6 – 5,8.

Medio MSS: 2.2 g l⁻¹ de mezcla basal MS (Murashige and Skoog, Duchefa), agar 0,8 % (p/v) o phytigel 3,5 % (p/v), sacarosa 1 % (p/v), pH 5,6 – 5,8.

Solución nutritiva: 1 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄ · 7 H₂O, 15 μM MnSO₄ · H₂O, 1 μM CuSO₄ · 5 H₂O, 1 μM ZnSO₄ · 7 H₂O, 30 μM H₃BO₃, 28 nM (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O, 100 nM CoSO₄ · 7 H₂O, 10 mM Ca(NO₃)₂ · 4 H₂O y 40 mg l⁻¹ Sequestrene 138 Fe.

1.2.3. Esterilización de semillas

En todos los casos, las semillas se incubaron con 1 ml de una solución compuesta por hipoclorito sódico (NaClO) al 5 % (v/v) y SDS al 0,5% (p/v) durante 5 min. Las semillas se enjuagaron con agua destilada (5-7 lavados) para eliminar los restos de NaClO y detergente. Para sincronizar su germinación, las semillas se estratificaron durante 24 h a 4 °C.

2. Manipulación del material biológico

2.1. Manipulación de microorganismos

2.1.1. Transformación genética de bacterias

Para la transformación de *E.coli DH5α* y *DB3.1* mediante choque térmico, se añadió un mínimo de 10 ng del DNA correspondiente a 100 μl de bacterias competentes. Se realizaron tres incubaciones secuenciales: 10 min en hielo, 1,5 min a 42 °C y de nuevo 5 min en hielo. Seguidamente se añadieron 500 μl de LB líquido y se incubaron a 37 °C durante una hora en agitación (200 rpm). Por último, para seleccionar las bacterias transformadas exitosamente, se sembró esta solución en placas de medio LB sólido con el antibiótico correspondiente.

Para la transformación de *A. tumefaciens* C58/pMp90 por electroporación, se mezcló 100 ng de DNA con 100 μl de bacterias competentes y se transfirió la mezcla a la cubeta de electroporación (1 mm, BioRad). La solución se sometió a un pulso eléctrico de 2,2 kV y 200

μ F en un sistema de electroporación “Micro Pulser” (BioRad). Seguidamente se añadió 1 ml de medio LB líquido y se agitó la muestra durante una hora a 37 °C y 200 rpm. Posteriormente se sembraron las bacterias en placas de LB sólido suplementadas con los antibióticos correspondientes y se incubaron toda la noche (o/n) a 37 °C para conseguir colonias bacterianas positivas.

2.2. Tratamiento del material vegetal

2.2.1. Transformación de *Arabidopsis thaliana* por infiltración floral

Se preparó un pre-inóculo de *A. tumefaciens* C58/pMp90, transformado con la construcción que correspondiese, en 3 ml de LB con 20 μ g ml⁻¹ de gentamicina, 50 μ g ml⁻¹ de rifampicina y el antibiótico correspondiente a la construcción usada. Este pre-inóculo creció a 28 °C en agitación (200 rpm). A las 8 h se tomaron 0,5 ml del pre-inóculo y se añadieron a un matraz con 500 ml de LB suplementado con 50 μ g ml⁻¹ de rifampicina y el antibiótico de la construcción usada. El cultivo creció en agitación (200 rpm) a 28 °C hasta que alcanzó una densidad óptica medida a λ 600 nm de 0,8-1. Se centrifugó el cultivo a 3500 rpm durante 10 min a 4 °C. Las células se resuspendieron en 200 ml del medio de infiltración. Las vainas y flores fecundadas de las plantas de *A. thaliana* que iban a ser transformadas fueron eliminadas, y se sumergió la parte aérea de la planta durante 2 min en el medio de infiltración (Clough and Bent, 1998). Las plantas transformadas se mantuvieron en bandejas con un 100 % humedad durante dos días y posteriormente se cultivaron en las condiciones anteriormente citadas. Las semillas resultantes de esta transformación (F₁) se propagaron hasta conseguir plantas transformantes positivas.

La composición de medio utilizado fue la siguiente:

Medio de infiltración: sacarosa 5% (p/v), Silwet L-77 0,02% (v/v).

2.2.2. Cruces de plantas mediante polinización dirigida

La obtención de dobles mutantes o el cruce de líneas mutantes y transgénicas se realizó mediante fecundación dirigida de individuos homocigotos cultivados en macetas. Se usó una lupa SZ 40 (Olympus) y unas pinzas (Dumoxel, n° 5) para eliminar las vainas, flores fecundadas y estambres de las plantas parentales femeninas, aislando el gineceo. Los pistilos

de estas plantas se fecundaron manualmente poniendo en contacto las anteras con polen de la línea parental masculina, favoreciendo la fecundación cruzada. Se realizaron cruces de plantas mutantes *cas-cl* (línea parental masculina) con los mutantes de desarrollo del pelo radical, así como los mutantes de respuesta a patógenos (líneas parentales femeninas).

Además, se cruzaron plantas transgénicas con la construcción *ProCl:CASC1-GFP* con plantas mutantes *cas-cl*. Ambas líneas se usaron como parental masculino y femenino.

Por último, se realizaron cruces entre las plantas transgénicas con la construcción *ProCOBL9:GFP* (línea parental femenina) y las plantas mutantes *cas-cl* (línea parental masculina).

2.2.3. Aislamiento de mitocondrias

Las muestras enriquecidas en mitocondrias se aislaron de raíces de *Arabidopsis* usando un gradiente de densidad, como se describe en (Struglics et al., 1993) con algunas modificaciones. Se trituraron parcialmente un total de 30 g de tejido de raíz y se maceraron en un mortero con N₂ líquido. La mezcla se resuspendió y homogeneizó en tampón de extracción en una proporción de 3 ml de tampón por g de peso fresco. El homogenado se filtró a través de dos capas de Miracloth (Calbiochem) y se centrifugó durante 5 min a 2200 g. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó secuencialmente a 3200 g y 4500 g durante 5 min hasta que se consiguió un pellet sin color verde (cloroplastos). El sobrenadante final se centrifugó a 18000 g durante 30 min y el pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de tampón de gradiente. Se generó un gradiente discontinuo de 45 % y 27 % (p/v) de Percoll para separar los orgánulos celulares y se centrifugó durante 20 min a 20000 g y 4 °C en una ultracentrífuga usando un rotor basculante SW28.1 Ti (Beckman). La banda mitocondrial se recogió cuidadosamente del gradiente, se diluyó diez veces con tampón de lavado y se centrifugó durante 15 min a 20000 g. Este lavado se repitió cuatro veces para eliminar los restos de Percoll. El pellet final se resuspendió en 300 µL de tampón de rotura y las mitocondrias se rompieron con 6 ciclos de congelación-descongelación en N₂ líquido, así como con 5 ciclos de ultrasonidos de 20 s a una amplitud del 20 %. Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 20000 g y las proteínas del sobrenadante se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) y acetona en hielo. Finalmente, las proteínas precipitadas fueron resuspendidas en 20 mM Tris-HCl, pH 8.0.

La composición de los medios utilizados fueron los siguientes:

Tampón de extracción: 15 mM MOPS (pH 7.4), 1.5 mM EDTA, 0.25 M sacarosa, 0.4 % BSA y 0.6 % (p/v) PVP-40

Tampón de gradiente: 20 mM MOPS, 0.6 M sacarosa, pH 7.2.

Tampón de lavado: 0.3 M sacarosa, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS, pH 7.2.

Tampón de rotura: 50 mM tampón de fosfato potásico, pH 7.0, y 0.1 % (v/v) Triton X-100

2.2.4. Aislamiento de protoplastos de raíces de *A. thaliana*

Las plantas crecieron sobre una malla durante 6 días en placas de Petri (100mm x 100mm x 15mm) con medio MSS-MES. Se sembraron unas 500-1000 semillas por placa, en una sola línea. Las raíces de 5-6 placas se recogieron de la malla, se trocearon con un bisturí y se depositaron en un filtro celular de 70 μ m (Falcon 352350), colocado en una placa Petri pequeña (Falcon 351008) con 7 ml de la solución B. Las raíces se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con una agitación de 85 rpm. El filtrado se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugó durante 6 min a 22 °C y 200 g. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió cuidadosamente el pellet de protoplastos y restos de raíces en 300 μ l de solución A. Se pasó la mezcla a través de un filtro celular de 70 μ m, y se recogió el filtrado que pasó de nuevo a través de un filtro celular de 40 μ m (Falcon 352340). El filtrado final se depositó en un tubo de 5 ml de poliestireno.

La composición de los medios utilizados fueron los siguientes:

Medio MS-MES: MS (Caisson MSP01), agar (10 g l⁻¹), MES (0,5 g l⁻¹) y sacarosa (10 g l⁻¹)

Solución A: manitol 600 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM, MES 2 mM, KCl 10 mM y BSA 0,1% (p/v), pH 5.5

Solución B: celulasa (15 g l⁻¹, Sigma #C1794) y pectilasa (1 g l⁻¹, Sigma #P3026) disueltas en solución A.

2.2.5. Citometría de flujo de células activadas por fluorescencia (FACS)

Para la clasificación de células activadas por fluorescencia se usaron protoplastos obtenidos de raíces de plantas de *A. thaliana* cultivadas durante 6 días en placas verticales de medio MSS (ver “Aislamiento de protoplastos de raíces de *A. thaliana*”).

Los protoplastos que expresaban la GFP se aislaron en un citómetro de flujo MoFlo Astrios EQ (Beckman-Coulter) con un capilar de 70 μm y una relación de 5000 a 10000 eventos por segundo. Se usó una presión de sistema de 60 psi. Como control negativo, se usaron protoplastos de raíces de plantas silvestres que no expresaban la GFP. Las células positivas para la expresión de la GFP se seleccionaron por la intensidad de su emisión a 530 nm comparada con la del control. Las células se recolectaron en tampón fosfato salino (PBS), se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron para la posterior extracción proteica.

La composición del medio utilizado fue la siguiente:

Tampón PBS: NaCl 80 g l⁻¹, KCl 2 g l⁻¹, Na₂HPO₄ 14.4 g l⁻¹ y KH₂PO₄ 2.4 g l⁻¹, pH 7.4

2.2.6. Tinciones

2.2.6.1. Tinción NBT para la detección del anión superóxido (O₂⁻)

Se cubrieron las raíces de plántulas cultivadas durante 3 días en medio MS (phytagel 3,5 g l⁻¹) suplementado con sacarosa 1 % (p/v), con la solución de tinción. Las plántulas se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 2 h y se visualizaron en un microscopio de campo claro (Olympus BX50) con una cámara digital (Leica DFC300FX).

La composición del medio utilizado fue la siguiente:

Solución de tinción: NBT (0,5 mg ml⁻¹; Sigma-Aldrich) disuelto en un tampón Tris-HCl (0.1 M), NaCl (0.1 M) y MgCl₂ (0.05 M), pH 9.5

2.2.6.2 Tinción H₂DCFDA para la detección de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Las plantas crecieron durante 14 días en placas verticales de medio MS suplementado con sacarosa (1%). Las raíces se incubaron durante 2 min en una solución de H₂DCFDA (Life

Technologies) 10 μM , en presencia de yoduro de propidio (Life Technologies) 10 μM para visualizar las paredes celulares. Las muestras se observaron en un objetivo Leica HCX PLAN-APO 363 1.4 NA de aceite de inmersión y un microscopio confocal TCS SP2 (Leica Microsystems) con una excitación de λ 488 nm y una emisión de λ 500-550 nm y λ 600-650 nm, para la detección de H₂DCFDA y yoduro de propidio, respectivamente.

2.2.6.3 Tinción Mitotracker Deep Red 633 para la detección de mitocondrias

Las raíces de plantas de 4 días se incubaron con una solución 20 nM de MitoTracker Deep Red (Molecular Probes) durante 10 min a temperatura ambiente. Las muestras se observaron al microscopio confocal (Leica Microsystems) como se detalla en el apartado anterior. Para la excitación se usó un láser de helio-neón a λ 644 nm. La luz emitida se recogió a través de un filtro dicróico (TD 488/543/633) y se separó espectralmente para su detección a λ 650–700 nm.

2.3 Interacciones planta-patógeno

2.3.1 Infecciones con *Pseudomonas syringae*

Las cepas bacterianas usadas fueron *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst* DC3000 (*Pst* DC3000) y *Pst* DC3000 portando un plásmido que contiene el gen de avirulencia *avrRpmI* (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRpmI*, *Pst* DC3000 *avrRpmI*) (Grant et al., 1995). Las cepas *Pst* DC3000 y *Pst* DC3000 *avrRpmI* se cultivaron en placas de LB suplementadas con rifampicina 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, gentamicina 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$, y en el caso de *Pst* DC3000 *avrRpmI* además, kanamicina 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Se recogieron las bacterias con 5 ml de MgCl₂ 10 mM. Las concentraciones se ajustaron a 5×10^6 bacterias ml^{-1} ($\text{DO}_{600} = 0.01$, *Pst* DC3000 *avrRpmI*) o 2.5×10^6 bacterias ml^{-1} ($\text{DO}_{600} = 0.005$, *Pst* DC3000). Para estos ensayos se utilizaron plantas cultivadas en tierra durante 60 días en ciclo corto. La suspensión bacteriana se infiltró por el envés de la hoja con una jeringa de 1 ml sin aguja. Como control, se infiltraron hojas con MgCl₂ 10 mM estéril (Swanson et al., 1988). Las plantas infiltradas se usaron para su observación al microscopio confocal o bien para el test de crecimiento bacteriano *in planta*.

2.3.2 Test de crecimiento bacteriano *in planta*

El protocolo para medir el crecimiento bacteriano se adaptó de (Tornerio and Dangl, 2001). Las plantas silvestres y mutantes se cultivaron durante 60 días en tierra en ciclo corto y se inocularon con *P. syringae* como se describe en el apartado anterior. Se tomaron muestras a los 0, 1 y 3 días tras la infección. Se trituraron 100 mg de hoja con 1 ml de MgCl₂ 10 mM. Para cada muestra, se añadieron 20 µl de este homogenado a los pocillos de una placa de microtitulación que contenían 180 µl de MgCl₂ 10 mM. Se realizaron diluciones seriadas y se sembraron gotas de 10 µl de cada una de ellas en placas Petri con medio LB suplementado con rifampicina 50 µg ml⁻¹. Las placas se incubaron a 30 °C durante 38-40 h y posteriormente se realizó el recuento de colonias. El número de unidades formadoras de colonias (CFU) por mg de peso fresco se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{cfu mg}^{-1} \text{ peso fresco} = 1000 (N \times 10^{d-1}) / \text{peso muestra},$$

donde *N* es el número de colonias contado en la dilución número *d*.

3. Ácidos nucleicos

3.1. Extracción de DNA genómico y plasmídico

Para la extracción del DNA genómico total de plantas se usaron 100 mg de hojas de *A. thaliana*. Se usó el kit DNAeasy Plant Minikit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El DNA plasmídico se extrajo de la cepa bacteriana correspondiente usando el QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), según el protocolo proporcionado por el fabricante.

3.2. Extracción de RNA y retrotranscripción

El RNA total se extrajo de 100 mg del tejido correspondiente de plantas de *Arabidopsis thaliana* usando el RNeasy Plant Minikit (Qiagen). Se retro-transcribieron 2 µg de RNA usando oligo (dT) y SuperscriptTM First-Strand Synthesis para RT-PCR (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3. PCR

Para la amplificación de los genes estudiados en esta tesis doctoral se usaron las parejas de oligonucleótidos que se detallan en la Tabla 5, así como Taq DNA polimerasa (Invitrogen). En todos los casos se amplificó el gen *UBQ10* como control interno.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo siguiendo un programa que constó de una incubación a 95 °C durante 5 min para desnaturalizar el DNA molde y 30-35 ciclos sucesivos de los siguientes pasos: desnaturalización, 30 s a 94 °C; alineamiento, 30 s a 65 °C; polimerización, 1 min por Kb a 72 °C. Tras ello, las muestras se mantuvieron 5 min a 72°C para asegurar la extensión completa de todas las moléculas amplificadas. Los fragmentos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en las PCR

NOMBRE	GEN	SECUENCIA 5'-3'
C1-F2	<i>CAS-C1</i>	TGATGGGAATTGGCAGTGGAGGCAC
C1-R2	<i>CAS-C1</i>	AATTGCTTGCCACGGTGTAGCTCCC
LBb1	T-DNA <i>SALK</i>	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
ProC1-F	Promotor <i>CAS-C1</i>	CACCGTAAAAACAAGACATCAAGTCCTCTG
ProC1-R	Promotor <i>CAS-C1</i>	GTTTCCTGAAGTAGGCTCTATCA
ProC1:CASC1-R	<i>CAS-C1</i>	ATCCACTGAACTGGCTTCA
GFP-R	<i>GFP</i>	CCCATTGACGTGAATGTAGACAC
GFP-R 350	<i>GFP</i>	CCCTTAAGCTCGATCCTG
UBQ-F1	<i>UBQ</i>	GATCTTTGCCGGAACAATTGGAGGATGG
UBQ-R1	<i>UBQ</i>	CGACTTGTCATTAGAAAGAAAGAGATAACA
rh2-1FW	<i>RHD2</i>	TGAATGGTATGAACCAAACCGC
rh2-1REV	<i>RHD2</i>	GGCTTACACACCTGAAACAACA
rh2GK-F	<i>RHD2</i>	CCGTGGTCTTAGATTCTTCTTG
rh2GK-R	<i>RHD2</i>	AATCAAAGCCATGTTCAGC

LB GABI	T-DNA GABI-kat	CCCATTGGACGTGAATGTAGACAC
nahG-F	<i>nahG</i>	AGCAGGGTGGCGAAGTGC
nahG-R	<i>nahG</i>	AGAGTTGGTGCCGGGATGC
pMDC32pre35S	<i>pMDC83</i>	CTCGACTCTAGAGGATCCC
NOST-pMDC32	<i>pMDC83</i>	CAACAGGATTCAATCTTAAGA

3.4. Limpieza de productos de PCR

Los DNA productos de PCR se purificaron del exceso de nucleótidos, oligonucleótido y sales usando QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5. Análisis de expresión mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La expresión de todos los genes se analizó mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 6) utilizando el programa “Vector NTI Advance 10” (Invitrogen). Todos los oligos debían tener una T_m de 60-65 °C, un contenido de G y C entre 40-50% y dar lugar a un amplicón de 100-200 pb.

Para la reacción de q-PCR se utilizó el kit “iQ SYBR Green Supermix” (Bio-Rad) y un termociclador iQTM5 (Bio-Rad). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µL que contenía: “iQ SYBR Green Supermix” 1x, 100 µM de cada uno de los oligonucleótidos directo y reverso y 1 ng µl⁻¹ de cDNA. Se realizaron tres réplicas experimentales por muestra y tres réplicas biológicas independientes para cada condición. La calidad del cDNA se analizó amplificando el gen de expresión constitutiva *GAPDH* utilizando las parejas de oligonucleótidos qGADPH-5-F y R y qGADPH-3-F y R, diseñados en los extremos 5’ y 3’ y detallados en la Tabla 3.

El programa de PCR utilizado constaba de una etapa inicial de desnaturalización de 10 min a 95 °C, seguida de 30-35 ciclos sucesivos de desnaturalización (15 s, 95 °C) e hibridación-amplificación (1 min, 60 °C). Los niveles de expresión de los genes fueron normalizados con la expresión constitutiva del gen *UBQ10*, restando el valor CT (Cycle Threshold) de *UBQ10* al valor de los genes correspondientes (ΔCT). La expresión de los genes en cada línea fue calculada como $2^{-(\Delta CT)}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en las qPCR

NOMBRE	GEN	SECUENCIA 5'-3'
q-CysC1F	<i>CAS-C1</i>	CCACACCGTGAGGGGAACTCT
q-CysC1R	<i>CAS-C1</i>	GCGTTGGTAGAGGGGAAGTC
qUbq10F	<i>UBQ</i>	GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAAG
qUbq10R	<i>UBQ</i>	AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT
qrhd2-F	<i>RHD2</i>	CGCGTCATCGAAATGCAT
qrhd2-R	<i>RHD2</i>	GCATGGTTTAGTGATTGAAGCA
qAtrbohD-F	<i>ATRBOHD</i>	GAGTGGTTCAAGGGAATAATG
qAtrbohD-R	<i>ATRBOHD</i>	ACACACTCGTGCAATAATTGT
qscn1-F	<i>SCN1</i>	TTGGAAGACCGGTGTCAAA
qscn1-R	<i>SCN1</i>	CATCACGTGGTTGTAGTATGGCT
qein2-F	<i>EIN2</i>	TTGTGAGCTTTGGAGTTTGG
qein2-R	<i>EIN2</i>	TGTACTTTCCCCAAAGCTCAG
QFMRH5	<i>MRH5</i>	GCTGCTTGCTGCTCAAATCC
QRMH5	<i>MRH5</i>	AATCCAGAGAATCCACCACG
QFFLA6	<i>FLA6</i>	CAAATCCAGCTCATGCTCTACC
QFRLA6	<i>FLA6</i>	TCTTGTCCCGTAGCCTGAGT
qRSL4-Fw	<i>RSL4</i>	CAGATTAAGTTGTTGAGCTCGG
qRSL4-R	<i>RSL4</i>	GAGACAAAAGGTTGTGATGGAA
qRHD6-Fw	<i>RHD6</i>	CCGGCTCAAGGAGGAAAA
qRHD6-R	<i>RHD6</i>	CGAATTCCTGTCTCGTTGTGA
qNPR1-FW	<i>NPR1</i>	ATATTTTCCACCAAGAACCA
qNPR1-REV	<i>NPR1</i>	TGCAATGGAGCTGACTAGGA
qGADPH-5-F	<i>GADPH</i>	TCTCGATCTCAATTTTGAAAA
qGADPH-5-R	<i>GADPH</i>	CGAAACCGTTGATTCCGATTC
qGADPH-3-F	<i>GADPH</i>	TTGGTGACAACAGGTCAAGCA
qGADPH-3-R	<i>GADPH</i>	AAACTTGTCGCTCAATGCAATC

3.6. Secuenciación de DNA

Todas las secuenciaciones de DNA realizadas en este trabajo se llevaron a cabo por la empresa STAB VIDA. Para ello, se necesitaron aproximadamente 0.2-1 μg de DNA y 30 pmol del oligonucleótido correspondiente.

3.7. Electroforesis de DNA

El DNA se visualizó con luz ultravioleta en geles de agarosa al 1 % (p/v) en tampón TBE 0,5x (Duchefa Biochemie), teñidos con bromuro de etidio 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y separados electroforéticamente con una corriente eléctrica de 100 V. Las muestras se cargaron en presencia de tampón de carga. El marcador usado fue 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

La composición del tampón de carga fue la siguiente: azul de bromofenol 0,25 % (p/v) y glicerol 15 % (p/v).

3.8. Obtención de construcciones génicas

Durante esta tesis doctoral se ha obtenido la construcción *ProC1:CASC1-GFP*. Esta construcción es una fusión traduccional de la región intergénica *PIPI-CAS-CI* (1442 pb) con las secuencias de los genes *CAS-CI* (1234 pb) y *GFP* (714 pb). Para generar esta construcción se amplificó por PCR, con la pareja de oligonucleótidos ProC1-F y ProC1:CASC1-R (Tabla 2), la región intergénica *PIPI-CAS-CI* (1442 pb) y se clonó en el vector pENTRY-DTOPO (Invitrogen). Posteriormente, este fragmento se transfirió al vector pMDC110 usando la tecnología GATEWAY (Invitrogen). La construcción final se comprobó por secuenciación y se introdujo por choque térmico en cepas competentes de *A. tumefaciens* C58/pMp90, que fueron posteriormente utilizadas para transformar plantas silvestres mediante infiltración floral.

4. Proteínas

4.1. Extracción proteica de *Arabidopsis thaliana*

Se recogieron 200 mg de hoja de plantas cultivadas durante 28 días (ciclo largo) o 2 meses (ciclo corto), 24 h después de un tratamiento en espray con ácido salicílico 0,5 mM. Como

control, se trataron las plantas con agua destilada en las mismas condiciones. Las proteínas se extrajeron con un tampón de extracción cuya composición se detalla a continuación.

Tampón de extracción: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0.1 % (v/v) Triton X-100, 0.2 % (v/v) Nonidet P-40 y 50 μ M MG132.

4.2. Cuantificación de proteínas totales

La concentración proteica se midió por espectrometría con el ensayo Bradford (Bradford, 1976) o con el reactivo “Pierce 660 nm Protein Assay Reagent” (Thermo Scientific) en los casos en que las muestras contuvieran detergentes no compatibles con el primer método.

4.3 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

A las muestras se les añadió tampón de carga en proporción 1:4 y se incubaron durante 15 min a 75 °C. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 8 o 12% (p/v), según correspondiese, y en un sistema “Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell” (Bio-Rad), usando un tampón Tris/Glicina/SDS. La electroforesis se llevó a cabo a un amperaje constante de 25 mA.

Para la visualización de las proteínas, los geles se sumergieron en solución de tinción Coomassie durante 1 h con agitación suave. A continuación, se realizaron 3 lavados de 15 min en agitación con solución desteñidora que permitió la visualización de las bandas de proteínas.

La composición de las soluciones utilizadas fue la siguiente:

Tampón de carga: Tris-HCl 60 mM, pH 6,8; glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v) y azul de bromofenol 0,01% (p/v).

Tampón Tris/Glicina/SDS: 25 mM Tris, 0.2 M Glicina, 20% (v/v) SDS, pH 8.3.

Solución de tinción Coomassie: Brilliant Blue R 2,5 g l⁻¹ (Sigma), metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v).

Solución desteñidora: etanol 30% (v/v) y ácido acético 10% (v/v).

4.4 Inmunodetección de proteínas

Para la detección inmunológica de NPR1 se extrajeron las proteínas como se describe en el apartado 4.1. Todas las muestras se ajustaron hasta contener 50 µg de proteína total y se desnaturalizaron con DTT 50 mM. Posteriormente, las proteínas se separaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) con geles al 8% (p/v), como se describe en el apartado anterior, y se transfirieron a una membrana de PVDF usando un sistema de transferencia semi seco TE 77 ECL (Amersham Bioscience). La membrana se bloqueó durante 2 h a temperatura ambiente con la solución de bloqueo. La incubación con el anticuerpo primario anti-NPR1 (1:1000, Agrisera) se realizó durante toda la noche en agitación a 4 °C, tras la cual se lavó la membrana 3 veces durante 5 min con solución PBS-T, a temperatura ambiente y agitación. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo, 1:10000) durante 2 h a temperatura ambiente y agitación, y se lavó cuatro veces durante 10 min con solución PBS-T. Finalmente la membrana se reveló con el reactivo de detección “ECL Select Western Blotting Detection Reagent” (GE Healthcare-Amersham) en un “ChemiDoc Imaging System” (BioRad).

La composición de las soluciones utilizadas fue la siguiente:

PBS-T: NaCl 80 g l⁻¹, KCl 2 g l⁻¹, Na₂HPO₄ 14.4 g l⁻¹, KH₂PO₄ 2.4 g l⁻¹, pH 7.4 y Tween-20 0.1% (v/v).

Solución de bloqueo: leche en polvo 5% (p/v) disuelta en PBS-T.

4.5 Determinación de actividades enzimáticas

4.5.1 Ensayo de actividad β-Cianoalanina sintasa (β-CAS)

La determinación de la actividad CAS se basó en la capacidad de la enzima CAS de liberar sulfuro a partir de cisteína y cianuro, siguiendo el protocolo descrito por (Meyer et al., 2003) y usando el coeficiente de extinción $15 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ (Papenbrock and Schmidt, 2000).

Para conseguir el extracto proteico, se usaron 100 mg de raíces de plántulas de *A. thaliana* cultivadas durante 14 días en placas verticales de medio MSS, que se homogeneizaron con 150 µl de tampón Tris-HCl 20 mM pH 8, y se centrifugaron a máxima velocidad durante 15 min y 4 °C.

La mezcla de reacción contenía un volumen total de 1 ml: 0,8 mM L-cisteína, 10 mM KCN, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0) y 50 µl de extracto proteico. La reacción se inició por la adición de la L-cisteína. Tras 15 min de incubación a 30 °C, la reacción se paró con 100 µl de FeCl₃ 30 mM y 100 µl de NNDPDD 20 mM (Siegel, 1965). Las muestras se incubaron 20 min en oscuridad y se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. La formación de azul de metileno se determinó por espectrofotometría a 670 nm.

La composición de las soluciones utilizadas fue la siguiente:

FeCl₃: FeCl₃ 30 mM disuelto en HCl 1.2 N

NNDPDD: N,N-dimetil-p-fenilendiamina 20 mM disuelta en HCl 7.2 N

4.5.2 Ensayo de actividad NADPH oxidasa

La actividad NADPH oxidasa de los extractos de raíces de *A. thaliana* se midió mediante una adaptación del protocolo descrito por (Kaundal et al., 2012). 50 mg de raíces de plantas cultivadas durante 14 días en medio MSS se homogeneizaron en 1 ml de tampón de extracción. El homogenado se filtró a través de una membrana *miracloth* doble y se centrifugó a 10000 g y 4 °C durante 45 min. El sobrenadante se centrifugó a 20300 g y 4 °C durante 1 hora y el pellet se resuspendió en tampón 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 4 °C, para conseguir el extracto proteico utilizado en la determinación enzimática.

La actividad NADPH oxidasa se determinó colorimétricamente con XTT (30-[1-[(fenilamino)-carboni]-3, 4-tetrazolium]-bis(4-metoxi-6-nitro) ácido benceno sulfónico) como sustrato. La mezcla de reacción contenía tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 0,5 mM XTT, 0.1mM NADPH y 5 µg del extracto proteico. Se midió el incremento de absorción lineal a λ 492 nm de la sal amarilla de formazán producida durante 2 h (coeficiente de extinción 21.6 mM⁻¹ cm⁻¹).

Tampón de extracción: 50 mM HEPES pH 7.2, 0.25 M sacarosa, 3 mM EDTA, 1 mM ditiotreitól (DTT), 3.6 mM L-cisteina, 0.1mM MgCl₂, 0.6 % (p/v) polivinilpirrolidona (PVP) e inhibidores de proteasas “Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets” (Sigma)

4.5.3. Ensayo de actividad guaiacol peroxidasa

La actividad guaiacol peroxidasa (GPX) mide la actividad de todas las peroxidases de la planta, ya que el guaiacol es un donador de electrones común en todas ellas (Vianello et al., 1997).

Para obtener el extracto proteico se usaron raíces de *A. thaliana* cultivadas durante 14 días en placas verticales de medio MSS. Se homogeneizaron 50 mg de tejido con 150 µl de tampón de extracción. Las muestras se centrifugaron a máxima velocidad y 4 °C durante 15 min y el sobrenadante se usó como extracto proteico para de determinación de la actividad enzimática.

La actividad GPX se determinó colorimétricamente con el guaiacol como sustrato. La mezcla de reacción contenía tampón fosfato potásico 50 mM a pH 6.1, 0.25 mM H₂O₂, 6.25 mM guaiacol y 5 µg de extracto proteico. Se midió durante 2 min el incremento lineal en la absorción a λ 470 nm del tetraguaiacol formado (coeficiente de extinción 26.6 mM⁻¹ cm⁻¹).

Tampón de extracción: tampón fosfato potásico 50 mM pH 6.1, EDTA 1 mM.

4.6 Análisis proteómico mediante espectrometría de masas

El material suplementario correspondiente al análisis proteómico realizado durante esta tesis doctoral ha sido incluido y puede consultarse en el repositorio institucional del Consejo Superior de Investigaciones Científicas DIGITAL.CSIC (<http://hdl.handle.net/10261/180311>), así como en la página web del grupo “Metabolismo de cisteína y señalización” del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (<https://www.ibvf.us-csic.es/descargas-grupo-metabolismo-cisteina>).

4.6.1 Análisis proteómico mitocondrial

Las proteínas de las muestras enriquecidas en mitocondrias usadas en este análisis proteómico se aislaron de raíces de *A. thaliana* como se describe en el apartado 2.2.3.

La cuantificación se llevó a cabo mediante la estrategia SWATH-MS (Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra) en el servicio de proteómica del Insituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba. Para ello, las proteínas se alquilaron y digirieron con tripsina como se describe en (Ortea et al., 2018)

Para generar la librería de espectros se llevó a cabo una aproximación DDA (*data-dependent acquisition*) usando un nano-LC-MS/MS. Se separó un microgramo de cada muestra en un sistema nano-LC Ekspert nLC415 (Eksigent, Dublin, CA, USA) a través de una columna Acclaim PepMap C18 (75 μm Å~25 cm, 3 μm , 100 Å) (Thermo Fisher Scientific) con un flujo de 300 nL min⁻¹. Como solventes se usaron agua (A) y acetonitrilo (B), ambos con 0.1 % (v/v) de ácido fórmico. Para el equilibrado de la columna el gradiente de corrida consistió en 5-30% B durante 120 min, 90 % B durante 10 min y 5 % B durante 20 min; 150 min totales de corrida. Los péptidos eluidos se inyectaron directamente en un espectrómetro de masas cuadrupolo TOF híbrido “Triple TOF 5600+” (Sciex, USA) con un sistema DDA ‘top 65’ en el modo positivo. Se utilizó un NanoSpray III ESI source (Sciex) para la interfaz entre el nLC y el MS, y se aplicó un voltaje de 2600 V. El modo de adquisición consistió en un barrido MS de 250 milisegundos (ms) de los 65 iones precursores destacados en el primer análisis MS, desde 350 hasta 1250 masa/carga (m/z), seguido de un análisis MS/MS desde 230 hasta 1700 m/z (tiempo de adquisición 75 ms) por un periodo total de 5.2 s. Los precursores fragmentados se añadieron a una lista de exclusión dinámica durante 15 s; se excluyó del análisis MS/MS cualquier ión monocarga.

Las identificaciones de péptidos y proteínas se realizaron usando el software Protein Pilot (versión 5.0.1, Sciex) con el algoritmo Paragon. La búsqueda se realizó con la base de datos de proteínas de *A. thaliana*, UniProt Swiss-Prot (Agosto 2016), especificando la modificación con yodoacetamida y otras posibles modificaciones de cisteínas. La proporción de falsos positivos (FDR) se estableció en 0.01 tanto para péptidos como para proteínas. El espectro MS/MS de los péptidos identificados se utilizó para generar la librería de espectros para la extracción de picos SWATH, usando el “add-in” MS/MSALL para el software PeakView (versión 2.1, Sciex) con la aplicación “SWATH Acquisition MicroApp” (version 2.0, Sciex). Los péptidos con un intervalo de confianza superior al 99 % (obtenido de la base de datos del Protein Pilot) se incluyeron en la librería de espectros.

Para la cuantificación relativa mediante SWATH se analizaron las mismas muestras utilizadas para generar la librería de espectros, usando el método DIA (*data-independent acquisition*). Cada muestra se analizó usando el equipo LC-MS y el gradiente LC descritos para obtener la librería de espectros pero se aplicó el método SWATH-MS. El método repetía un ciclo que consistía en la adquisición de 34 lecturas TOF MS/MS de ventanas solapantes de aislamiento de precursores secuenciales de 25 m/z (solapamiento 1 m/z) cubriendo el rango de masas de

400 a 1250 m/z con una lectura TOF MS previa (400 a 1250 m/z, tiempo de adquisición 50 ms) para cada ciclo. El tiempo total del ciclo fue de 3,5 s.

La extracción de datos del cromatograma de iones fragmento de las corridas SWATH se llevó a cabo por PeakView (version 2.1) con el MS/MSALL, con la aplicación “SWATH Acquisition MicroApp” (version 2.0). Esta aplicación procesa los datos usando la librería de espectros creada de los datos dirigidos. Se seleccionaron más de 10 péptidos por proteína y 7 fragmentos por péptido, basándose en la intensidad de la señal. Cualquier péptido compartido o modificado se excluyó del procesamiento. Se usaron ventanas de 12 min y 20 ppm para conseguir los cromatogramas de iones. La cuantificación SWATH se realizó para todas las proteínas de la librería de iones identificadas por el Protein Pilot con un FDR por debajo del 1 %. Los cromatogramas de iones se generaron de cada ión fragmento seleccionado. Las áreas de los picos de los péptidos se obtuvieron sumando las áreas de los picos de los iones fragmento correspondientes. *PeakView* calculó un FDR y una puntuación para cada péptido asignado según los componentes cromatográficos y del espectro. Solo se cuantificaron los péptidos con un FDR por debajo del 5%. La cuantificación de las proteínas se calculó sumando las áreas pico de los péptidos correspondientes. Para analizar la abundancia diferencial de proteínas en los dos grupos, se usó MarkerView (version 1.2.1, Sciex) para la normalización de la señal.

4.6.2 Análisis proteómico de pelos radicales

Para el análisis proteómico de pelos radicales se utilizaron protoplastos de raíces de *A. thaliana* cultivadas durante 6 días en placas verticales de medio MSS. Los protoplastos que expresaban la proteína GFP se seleccionaron por citometría de flujo de células activadas por fluorescencia (FACS). El análisis proteómico de estos protoplastos se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica de la Universidad de Duke, USA.

Se realizó una extracción de proteínas totales y se determinó la concentración de cada una de las muestras mediante un ensayo Bradford (Bradford, 1976). Las concentraciones se normalizaron con 50 mM NH_4HCO_3 pH 8.0 hasta conseguir entre 0.1-1 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$. Para mejorar la solubilidad de las proteínas se añadió un surfactante ácido Rapigest SF (Waters) 0.2% (v/v). Posteriormente, las proteínas se incubaron durante 10 min a 40°C y agitación, se redujeron con DTT 10 mM y se incubaron de nuevo durante 15 min a 80°C y agitación. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se alquilaron con yodoacetamida 20 mM. Seguidamente, se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. La digestión se realizó con

tripsina en una proporción 1:50 durante al menos 4 h. Se centrifugaron las muestras y se añadió TFA 0,5- 1.0 % (v/v) y acetonitrilo 2 % (v/v). Se agitaron las muestras a 60 °C durante 2 h y se centrifugaron a 15000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un vial de muestreador automático.

Se analizó 1 µg de proteína en un gradiente LC-MS/MS de 90 min en el espectrómetro de masas “Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap”, (Thermo Scientific). Los datos LC-MS y MS/MS se procesaron con el programa Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Scientific) y se analizaron para identificación en MASCOT (Matrix Science) frente a las bases de datos TAIR10. La tolerancia de error en la búsquedas fue de 5 ppm para los iones precursores y 0.02 D para los iones productos permitiendo hasta 2 errores de corte con tripsina. Los espectros de búsquedas fueron importado en el programa Scaffold v4.8 (Proteome Software) y se estableció un límite de error FDR< 1% usando el algoritmo PeptideProphet.

5. Análisis de metabolitos

5.1. Cuantificación del contenido de cianuro

Para determinar los niveles de cianuro se usaron raíces de plantas *A. thaliana* cultivadas durante 14 días en medio MSS. Se homogeneizaron 100 mg de tejido en un tampón fosfato borato en la proporción 2 ml g⁻¹ de peso fresco. Los homogenados se centrifugaron a 15000 g y 4 °C durante 15 min. El cianuro extraído de las muestras se cuantificó en un HPLC de fase reversa mediante la derivatización del NDA (2,3-naftalenedialdehído) hasta 1-ciano-2-alkil-benz[f]isoindol en presencia de taurina, como se describe previamente en (Lin et al., 2005; Garcia et al., 2010)

La composición del tampón fosfato-borato fue la siguiente: 27 mM Na₂[B₄O₅(OH)₄].8H₂O (borato sódico) y 47 mM K₂HPO₄ (fosfato potásico), pH 8

5.2. Cuantificación del contenido de etileno liberado

Para determinar el contenido de etileno liberado se recogieron 100-600 mg de raíces de plantas cultivadas durante 13 días en placas verticales de medio MSS, se pesaron y se introdujeron en viales de cristal de 12 ml de capacidad. Los viales se sellaron y el contenido de etileno liberado por las raíces se midió a las 24 h por cromatografía de gases. Se inyectó 1 ml del gas del vial

en un cromatógrafo de gases GC2010 Shimadzu equipado con una columna alúmina activada y un detector de ionización de llama. Las temperaturas del horno y el detector se mantuvieron a 80 y 150 °C, respectivamente (Castellano and Vioque, 2002).

5.3. Cuantificación de ácido salicílico

Para la determinación de los niveles de la hormona vegetal ácido salicílico (SA) se utilizaron hojas de plantas adultas cultivadas durante 60 días en ciclo corto. Este material se repartió en viales de 200 mg cada uno y se determinaron mediante espectrometría de masas en el servicio de análisis de hormonas vegetales del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, (Valencia).

5.4. Cuantificación de los niveles de ATP

El ATP se extrajo de las raíces de *A. thaliana* siguiendo los protocolos descritos en (Yang et al., 2002; Li et al., 2017). 50 mg de tejido se mezclaron con 100 µl de agua destilada muy fría e inmediatamente se incubaron las muestras a 100 °C durante 10 min. Los lisados se centrifugaron a 15000 g y 4 °C durante 5 min y los sobrenadantes se usaron para la determinación de ATP. Esta determinación de ATP se llevó a cabo con el kit “ATP Determination kit” (ThermoFisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, y en un Varioskan Flash (Thermo Scientific).

6. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos ANOVA se realizaron usando el programa StatPlus LE (StatPlus, AnalystSoft Inc. - statistical analysis program. Version v6).

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Caracterización del papel regulador del cianuro en el desarrollo del pelo radical en *Arabidopsis thaliana*

Resultados previos del grupo de investigación proponían un papel señalizador para el cianuro en el proceso de desarrollo del pelo radical de *A. thaliana* (Garcia et al., 2010). La proteína mitocondrial CAS-C1 cataliza la incorporación de cianuro a la molécula de cisteína generando sulfuro de hidrógeno y β -cianoalanina y contribuyendo al mantenimiento de los niveles de cianuro por debajo de concentraciones tóxicas para la célula. Para analizar la participación del cianuro en la formación del pelo radical, se realizaron, por tanto, diferentes aproximaciones.

1.1 Estudio espacio-temporal de la expresión de la proteína CAS-C1

Con objeto de estudiar la expresión y localización de la proteína CAS-C1 en *A. thaliana*, se utilizaron dos construcciones génicas, *ProC1-GFP* y *ProC1:CASC1-GFP*.

- *ProC1-GFP*, es una fusión transcripcional de la región intergénica *PIP1-CAS-C1* (*ProC1*, 1442 pb) y la secuencia génica de la proteína verde fluorescente (GFP; 714 pb; Fig. 9A).
- *ProC1:CASC1-GFP*, es una fusión traduccional de la región intergénica *PIP1-CAS-C1* (*ProC1*, 1442 pb) con las secuencias nucleotídicas que codifican las proteínas CAS-C1 (1234 pb) y GFP (714 pb) generando una proteína de fusión entre ambas (Fig. 9A).

Hemos considerado que la región intergénica *PIP1-CAS-C1* que comprende desde la base inmediatamente posterior al codón de parada del gen *PIP1* hasta el codón de inicio del gen *CAS-C1* (Fig. 9B), incluye todas las secuencias reguladoras de la expresión del gen *CAS-C1*.

Para generar la construcción *ProC1:CASC1-GFP* se amplificó por PCR la región intergénica *PIP1-CAS-C1* (1442 pb) y la región genómica del gen CAS-C1 (1234 pb) y se clonó en el vector pENTRY-DTOPO (Invitrogen). Posteriormente, este fragmento se transfirió al vector pMDC110 usando la tecnología GATEWAY (Invitrogen) para realizar la fusión a la proteína GFP. La construcción final se introdujo mediante choque térmico en cepas competentes de *Agrobacterium tumefaciens* C58/pMp90, que fueron posteriormente utilizadas para transformar plantas silvestres mediante infiltración floral.

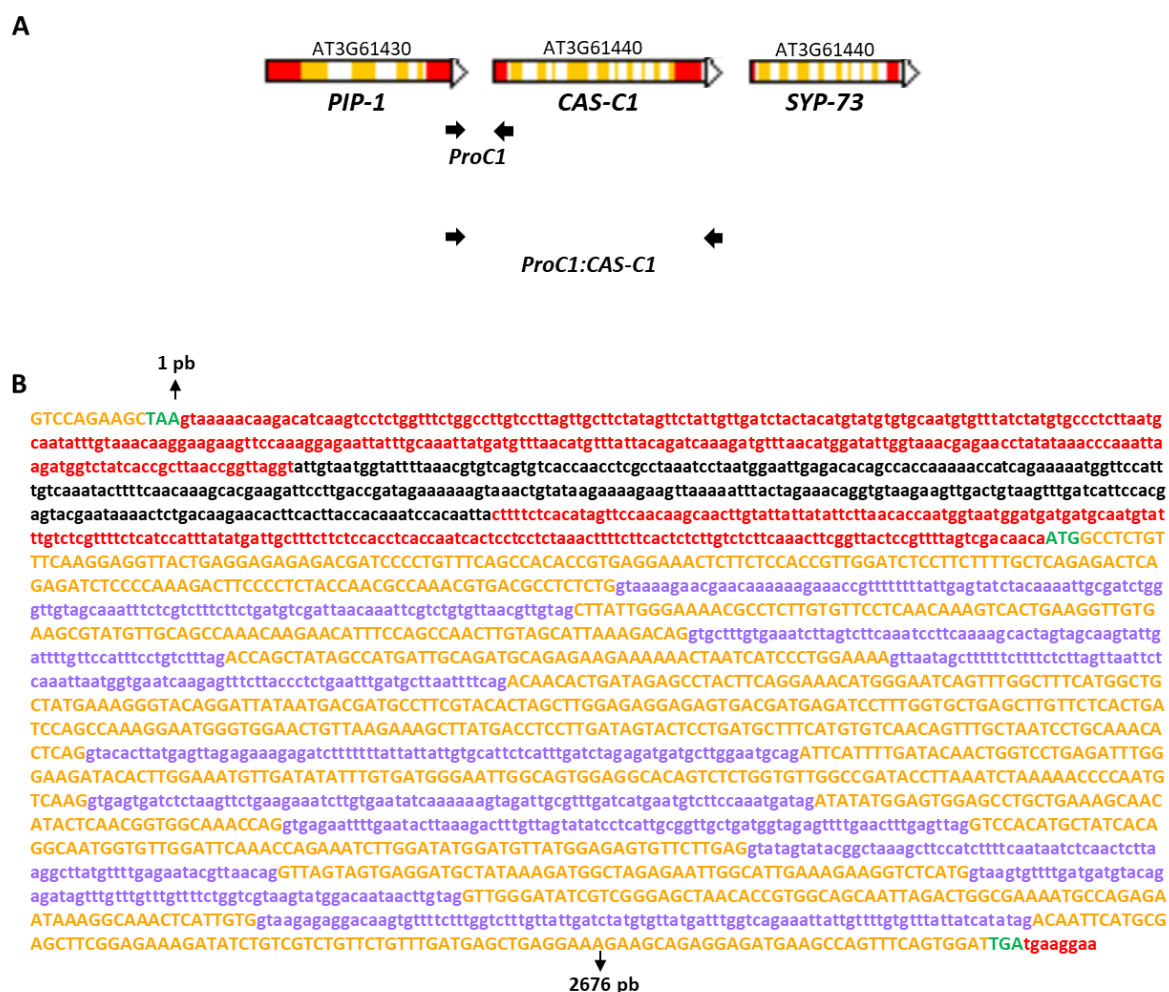


Figura 9. Región cromosómica flanqueante del gen *CAS-C1*. (A) Diagrama de las regiones intergénicas flanqueantes de *CAS-C1*, entre los genes *PIP1* y *SYP-73*, en el cromosoma 3 del genoma de *A. thaliana* (www.arabidopsis.org). Las flechas amarillas indican la dirección de transcripción de los diferentes genes representados. Las flechas negras indican la posición de los oligonucleótidos diseñados para aislar la secuencia *ProC1: CAS-C1* (B) Secuencia de nucleótidos desde el codón de parada del gen *PIP1* hasta el codón de parada del gen *CAS-C1* (*ProC1: CAS-C1*). Las letras en color representan los intrones (morado), regiones UTR (rojo) y exones (amarillo). Las letras verdes representan codones de inicio o parada de la transcripción.

Tanto el análisis de la secuencia de *CAS-C1* como su capacidad de dirigir la localización de la GFP a la mitocondria en expresiones transitorias han determinado que *CAS-C1* se haya clasificado como una proteína mitocondrial (Yamaguchi et al., 2000; Maruyama et al., 2001). Para confirmar esta localización subcelular, hemos observado mediante microscopía confocal la acumulación de fluorescencia de la proteína de fusión *CASC1-GFP* bajo el promotor del gen *CAS-C1* en plantas transgénicas que contenían la construcción *ProC1: CASC1-GFP*, cultivadas durante 4 días en medio MS suplementado con 1 % sacarosa (medio MSS).

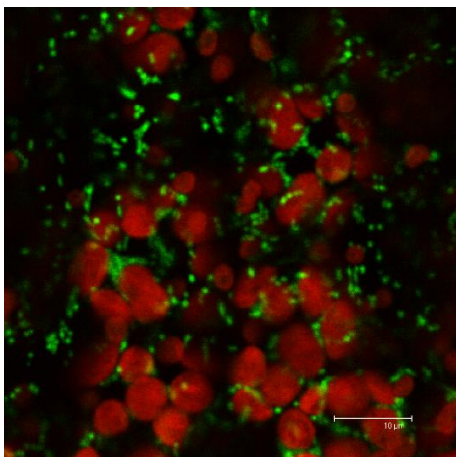


Figura 10. Localización mitocondrial de CAS-C1. Se obtuvieron plantas transgénicas con la construcción *ProCl:CASC1-GFP* y se observaron sus cotiledones a los 4 días al microscopio confocal. En verde se muestra la acumulación de fluorescencia de GFP en las mitocondrias, dirigida por la fusión a CAS-C1 en células del mesófilo de hoja. En rojo se muestra la autofluorescencia de los cloroplastos. Escala = 10μm.

En la figura 10 se observa un punteado pequeño de color verde en células del mesófilo de hoja, de aproximadamente 1 μm de diámetro, que se corresponde con la señal de la GFP en las mitocondrias. Se observa además, una señal de color rojo, de mayor tamaño, que se corresponde con la autofluorescencia de los cloroplastos.

Para confirmar que la señal obtenida era realmente mitocondrial, realizamos también una tinción con el reactivo Mitotracker Deep Red 633, que tiñe las mitocondrias de las células vivas. En esta ocasión se utilizó tejido de raíz para evitar la autofluorescencia de los cloroplastos. Se observa que la señal de fluorescencia de la GFP dirigida por la proteína CAS-C1 y la señal del Mitotracker Deep Red 633 coinciden, confirmando su localización mitocondrial. Además, en los pelos radicales, la fluorescencia se localiza preferentemente en la punta del pelo radical donde hay una elevada acumulación de mitocondrias (Fig. 11C)

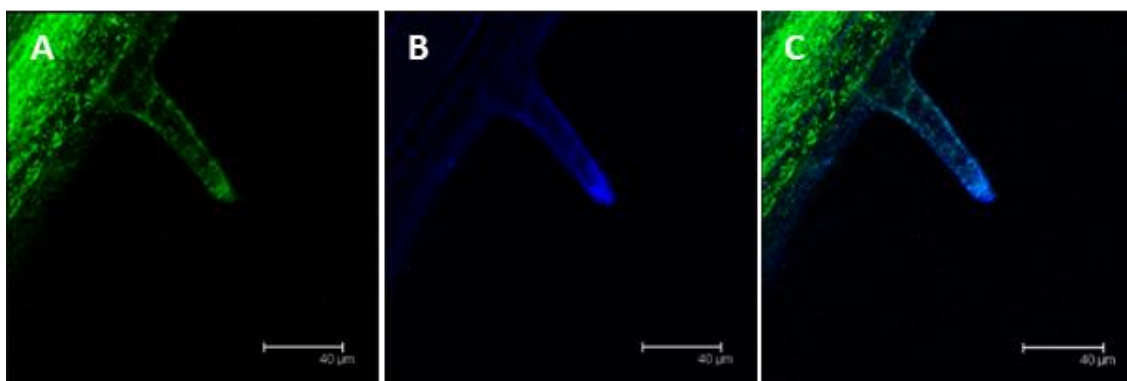


Figura 11. Localización mitocondrial de la proteína CAS-C1. Se tiñeron con Mitotracker Deep Red 633 durante 15 minutos plántulas *ProCI:CASC1-GFP* cultivadas durante 4 días en placas verticales con medio MSS. Posteriormente se enjuagaron con agua destilada y se observaron las raíces al microscopio confocal. Se muestran proyecciones máximas de 20 secciones ópticas de **A)** fluorescencia de la GFP (pseudocolor verde) **B)** fluorescencia del colorante Mitotracker Deep Red 633 del mismo tejido (pseudocolor azul) **C)** superposición de las imágenes A y B. Escala = 40 μm .

Para estudiar la localización tisular de la proteína CAS-C1 en *A. thaliana*, utilizamos plantas transgénicas *ProCI-GFP*, que expresaban la proteína GFP bajo el control del promotor del gen CAS-C1. Cultivamos estas plantas durante 7 días en placas verticales de medio MSS y las observamos en el microscopio confocal. Detectamos fluorescencia de la GFP en todos los tejidos de la planta, tanto en raíces como en cotiledones y hojas (Fig. 12). Además, cabe resaltar que la GFP, también se localiza en los primordios de los pelos radicales, como se observa en la Figura 12A. Confirmamos así los resultados obtenidos previamente (base de datos TAIR), en los que ya se describió que la expresión del gen *CAS-C1* es muy ubicua y que varía dependiendo del tejido y estadio de la planta.

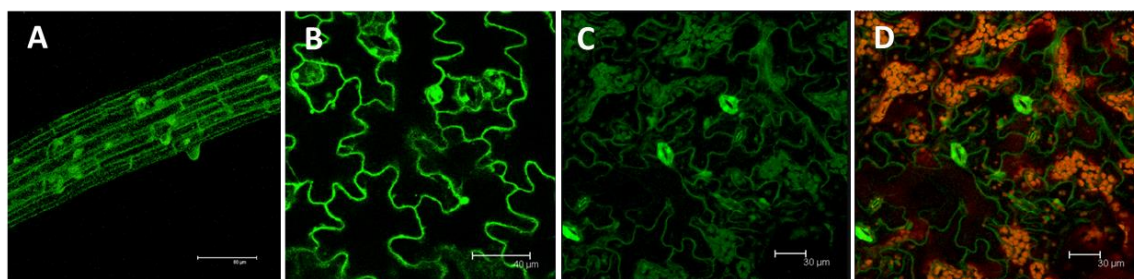


Figura 12. Expresión de la GFP bajo el control del promotor de CAS-C1 (*ProCI-GFP*) en plántulas de *A. Thaliana*. Se muestran imágenes representativas de la fluorescencia de la GFP (verde) y la autofluorescencia de los cloroplastos (rojo), obtenidas mediante microscopía confocal, de plántulas cultivadas 7 días en medio MSS en placas verticales. **A)** raíz y primordios del pelo radical. Escala = 80 μm **B)** cotiledón Escala = 40 μm **C)** hoja. Escala = 30 μm **D)** superposición de las imágenes de la fluorescencia de la GFP y la autofluorescencia de los cloroplastos de la foto C, Escala = 30 μm

Para profundizar en la localización de la proteína CAS-C1 en los pelos radicales, se realizaron diferentes líneas transgénicas que expresaban la construcción *ProC1:CASC1-GFP* en fondos genéticos silvestre y los mutantes *cas-c1*, *rhd2* y *scn1-1*, que presentan alteraciones en el desarrollo del pelo radical. El gen *SCN1* codifica un regulador negativo de las Rho-GTPasas (ROPs) (Carol et al. 2005), que se acumulan específicamente en la base de la protuberancia inicial del pelo radical y regulan la actividad de una NADPH oxidasa, codificada por el gen *RHD2*, responsable de la generación de ROS y calcio en la punta del pelo radical y que son indispensables para su correcta elongación (Foreman et al. 2003; Jones et al. 2007; Ishida et al. 2008).

Se obtuvieron 8 líneas transgénicas independientes en fondo silvestre, 3 en fondo *cas-c1*, 6 en fondo *rhd2* y 2 en fondo *scn1-1*. Tras comprobar que las diferentes líneas de cada fondo genético no presentaban diferencias estadísticamente significativas en intensidad y/o localización de la fluorescencia, se seleccionó una única línea de cada fondo genético para los ensayos posteriores de microscopía confocal.

Como se observa en la figura 13, en todos los fondos genéticos la fluorescencia de la raíz es bastante intensa. En el fondo genético silvestre, las raíces presentan un patrón de expresión uniforme, mientras que en el pelo radical se observa un incremento en la localización de CASC1-GFP en la punta del pelo, como se mostró anteriormente (Fig. 13A, D y G). Esta localización apical se mantiene desde estadios muy tempranos en el proceso de desarrollo del pelo radical hasta su desarrollo completo. En los fondos genéticos mutantes *rhd2* y principalmente *scn1-1*, se pierde esta acumulación apical de CASC1-GFP, a pesar de que se mantiene la localización mitocondrial de CASC1-GFP (Fig. 13B-E-H y 13C-F-I).

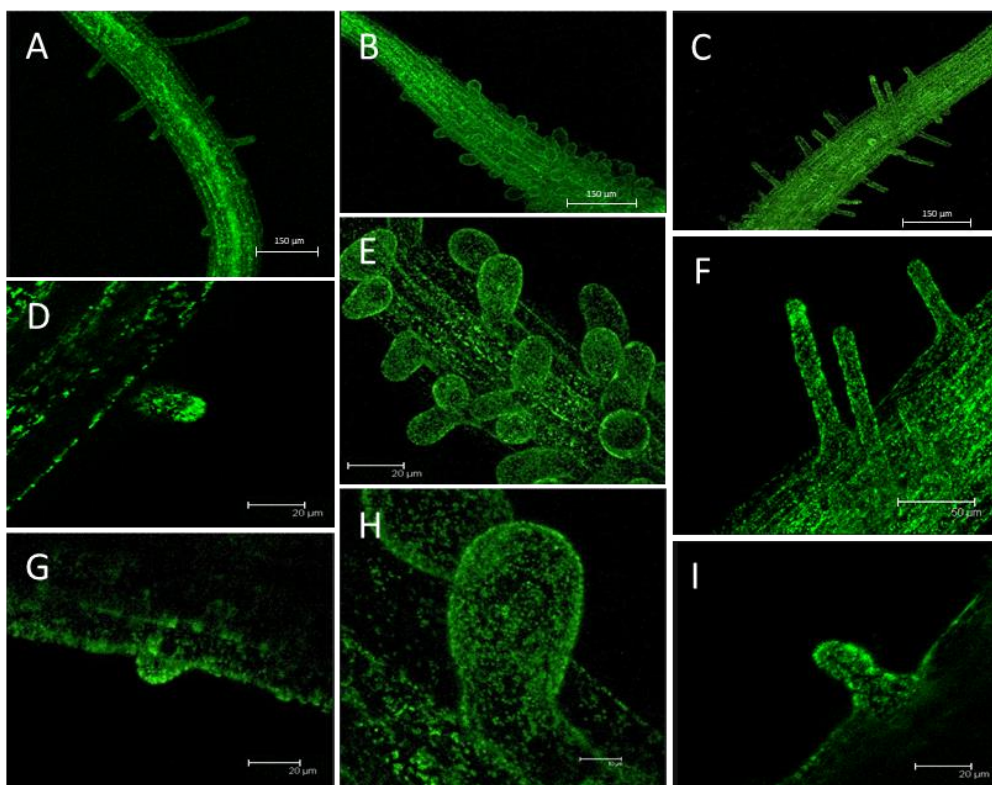


Figura 13. Expresión de CASC1-GFP en raíces de plantas silvestres y mutantes *rhd2* y *scn1-1*. Se muestran imágenes representativas de la fluorescencia de GFP de plantas silvestres (A, D, G), mutante *scn1-1* (B, E, H) y mutante *rhd2* (C, F, I), transformadas con la construcción *ProC1:CASC1-GFP*. Las plantas crecieron 2 días en medio MSS. Las imágenes son proyecciones máximas de 20 secciones ópticas. Escala = 150 µm (A, B, C), 50 µm (F), 20 µm (D, E, G, I) y 10 µm (H).

Además, se observó que en el fondo genético mutante *cas-c1* se revertía parcialmente el fenotipo de pérdida de pelo radical, ya que algunos pelos radicales conseguían elongar e incluso recuperaban la acumulación de CASC1-GFP en la punta del pelo radical, característica de las plantas silvestres (Fig. 14).

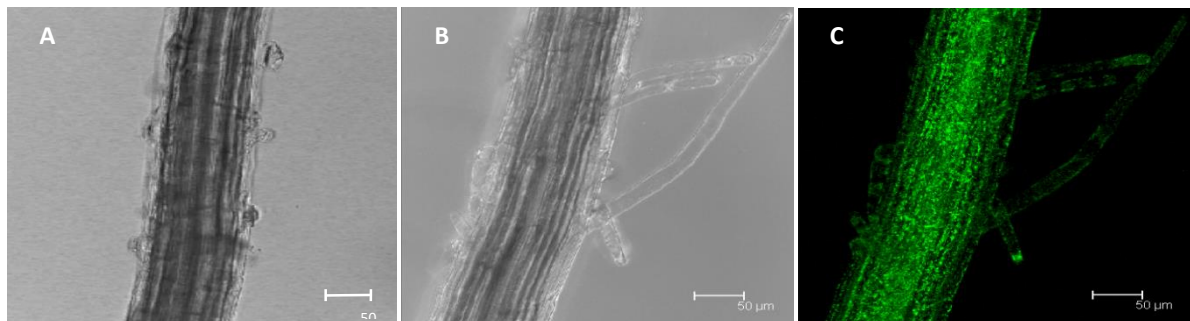


Figura 14. Fenotipo de raíz de la línea mutante *cas-c1* y la línea complementada. (A) Imagen representativa de campo claro de raíces de plantas mutantes *cas-c1* cultivadas durante 4 días en placas con medio MSS. (B) Imagen de campo claro y (C) de fluorescencia de GFP, de plantas mutantes *cas-c1* transformadas con la construcción *ProC1:CASC1-GFP* y cultivadas durante 4 días en medio MSS. Escala = 50 µm.

1.2 Caracterización de mutantes en desarrollo de pelo radical en *Arabidopsis thaliana*

1.2.1 Análisis transcripcional de los mutantes

Con objeto de profundizar sobre el papel del cianuro en el proceso de formación del pelo radical, se analizó la expresión de *CAS-C1* en los mutantes *scn1-1* y *rh2*. Para ello, se recogieron raíces de las líneas silvestre y mutantes *cas-c1*, *scn1-1* y *rh2* cultivadas durante 7 días en placas verticales de medio MSS. Se extrajo el RNA de estas muestras y posteriormente se obtuvo el cDNA con el que se realizaron las RT-PCRs en tiempo real (Fig. 15).

La expresión del gen *CAS-C1* en el mutante *cas-c1* se reduce drásticamente, confirmando que el mutante *cas-c1* es un mutante “*knock out*”. En la figura 15 se observa que la expresión de *CAS-C1* en el fondo *scn1-1* se reduce notoriamente mientras que la expresión de *CAS-C1* en *rh2* no se reduce, incluso aumenta. Según estos datos, la mutación *scn1-1* podría ser epistática sobre la mutación *cas-c1* y *rh2* sería independiente o hipostática a *cas-c1*.

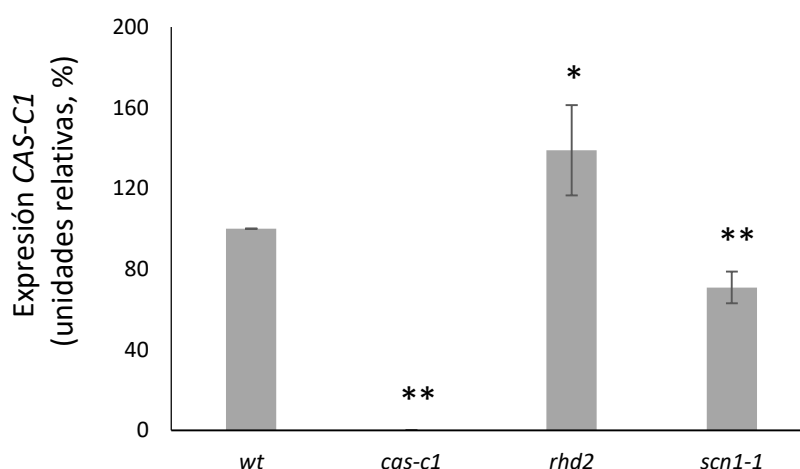


Figura 15. Análisis transcripcional del gen *CAS-C1* en las líneas mutantes del pelo radical. Análisis de expresión por RT-PCR en tiempo real del gen *CAS-C1* en raíces de plantas silvestres, *cas-c1*, *rh2* y *scn1-1* cultivadas en medio MSS durante 7 días. Los niveles de transcrito se normalizaron con el gen constitutivo *UBQ10*. Los valores son medias \pm SD de tres determinaciones independientes. ($P^{**}<0,01$; $P^{*}<0,05$).

1.2.2 Análisis fenotípico de los mutantes de pelo radical

Para confirmar y profundizar en las relaciones de epistasia propuestas a partir del análisis transcripcional, se realizaron cruces de las líneas mutantes *rh2* y *scn1-1* con *cas-c1*,

generándose los mutantes dobles *rh2 cas-c1* y *scn1-1 cas-c1*. Sus fenotipos se muestran en las figuras 16 y 17.

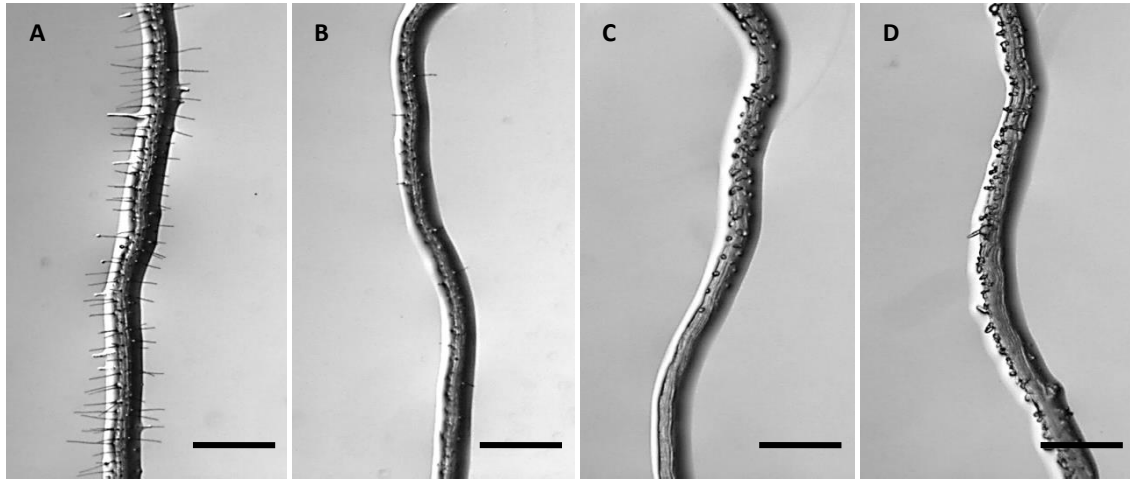


Figura 16. Fenotipo de las líneas mutantes simples y dobles del desarrollo del pelo radical. (A) silvestre (B) *cas-c1*, (C) *scn1-1*, (D) *scn1-1 cas-c1*. Las plántulas crecieron durante 6 días en placas verticales de medio MSS, pH 5.7. Se muestran imágenes representativas de cada línea. Escala = 0,5 mm.

En la figura 16B se observa que el mutante *cas-c1* presenta pelos radicales abortivos, deformes, que no llegan a elongar, como se había descrito anteriormente (Garcia et al., 2010). Tanto el mutante simple *scn1-1* como el mutante doble *scn1-1 cas-c1* desarrollan múltiples protuberancias, primordios de pelos radicales, que al igual que en el mutante *cas-c1*, no elongan (Fig. 16C y 16D). El fenotipo del doble mutante, similar al del mutante simple *scn1-1*, confirma que la mutación *scn1-1* es epistática sobre *cas-c1*.



Figura 17. Fenotipo de las líneas mutantes simples y dobles del desarrollo del pelo radical. (A) Silvestre (B) *cas-c1*, (C) *rhd2*, (D) *rhd2 cas-c1*. Las plántulas crecieron durante 7 días en placas verticales de medio MSS, pH 4. Se muestran imágenes representativas de cada línea. Escala = 0,15 mm.

El mutante *rhd2* desarrolla pelos radicales deformes y más cortos que la línea silvestre (Fig. 17C). En este caso, el mutante *rhd2 cas-c1* presenta un fenotipo similar al mutante simple *cas-c1* y no al mutante *rhd2* (Fig. 17D), demostrando así la epistasia de *cas-c1* sobre *rhd2*.

1.2.3 Reversión fenotípica en presencia de hidroxocobalamina

La hidroxocobalamina es una molécula utilizada como antídoto clínico en las intoxicaciones por cianuro. Posee un átomo de cobalto (Co) con el que reacciona el cianuro libre produciendo cianocobalamina (vitamina B12), una sustancia inocua. La adición de hidroxocobalamina al medio no tiene ningún efecto en las raíces de las plantas silvestres, pero es capaz de revertir el fenotipo de ausencia de pelos radicales en el mutante *cas-c1* (García et al., 2010). Para estudiar el fenotipo de los mutantes de pelos radicales de este trabajo en presencia de hidroxocobalamina, cultivamos plantas silvestres, mutantes simples *scn1-1* y *rhd2*, y mutantes dobles *scn1-1 cas-c1* y *rhd2 cas-c1* durante tres días en placas verticales de medio MSS suplementado o no con hidroxocobalamina, según correspondiese. Estas plantas fueron observadas al microscopio y/o la lupa óptica y sus fenotipos se muestran en la figura 18.

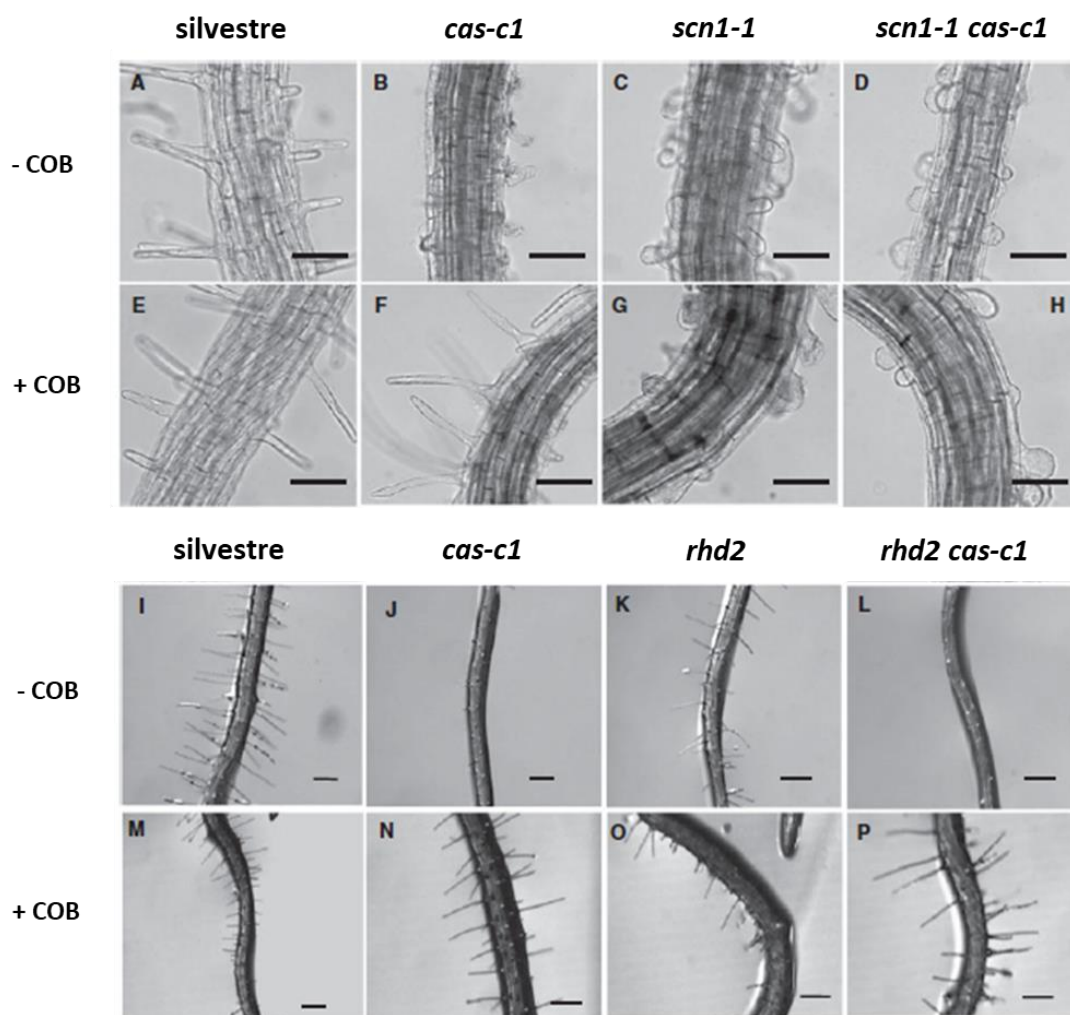


Figura 18. Efecto de la hidroxocobalamina en la formación del pelo radical. (A–D) Fenotipo de plantas silvestres y mutantes *cas-c1*, *scn1-1* y *scn1-1 cas-c1*, cultivadas durante 3 días en placas MSS verticales en ausencia de hidroxocobalamina. (E–H) Fenotipo de plantas silvestres y mutantes *cas-c1*, *scn1-1* y *scn1-1 cas-c1*, cultivadas durante 3 días en placas MSS verticales en presencia de hidroxocobalamina 5 mM. (I–L) Fenotipo de plantas silvestres y mutantes *cas-c1*, *rhd2* y *rhd2 cas-c1*, cultivadas durante 7 días en placas MSS verticales, pH 4, en ausencia de hidroxocobalamina. (M–P) Fenotipo de plantas silvestres y mutantes *cas-c1*, *rhd2* y *rhd2 cas-c1*, cultivadas durante 7 días en placas MSS verticales, pH 4, en presencia de hidroxocobalamina 5 mM. Los experimentos se repitieron al menos 3 veces con resultados similares. Escala = 0,5 mm.

Comparando los fenotipos de la figura 18, de las plantas cultivadas en presencia de hidroxocobalamina, se observa que las plantas *cas-c1* son capaces de revertir el fenotipo de desarrollo de pelos radicales, como estaba descrito, hecho que no ocurre ni en las plantas *scn1-1* ni *scn1-1 cas-c1* (Fig. 18C, 18G y 18D, 18H). Este resultado sugiere que la acumulación de cianuro como consecuencia de la mutación *cas-c1* no está involucrada en el fenotipo presentado por *scn1-1*.

Por otra parte, el tratamiento con hidroxocobalamina revierte el fenotipo de pérdida de pelos radicales del mutante doble *rhb2 cas-c1* hasta el fenotipo de pelos radicales cortos y deformes del mutante simple *rhb2*, pero no revierte el fenotipo de *rhb2* (Fig. 18K, 18O y 18L, 18P), lo cual indica que la eliminación del cianuro producido por la mutación *cas-c1* produce en los dobles mutantes una recuperación del fenotipo de la mutación simple *rhb2* que es compatible con una relación de epistasia de *cas-c1* sobre *rhb2*.

El efecto de la hidroxocobalamina en los fenotipos de los fondos genéticos *scn1-1* y *rhb2* confirma las relaciones de epistasia entre estos genes y *CAS-C1* propuestas con anterioridad.

1.2.4 Análisis de expresión de genes de desarrollo de pelo radical en los dobles mutantes *scn1-1 cas-c1* y *rhb2 cas-c1*

Para completar el análisis transcripcional previo y profundizar en las relaciones de epistasia descritas, se analizaron los niveles de expresión de otros genes involucrados en el desarrollo del pelo radical, y de los que se sabe, por estudios previos del grupo de investigación, que se reprimen en el mutante *cas-c1* (García et al., 2010).

El desarrollo del pelo radical implica múltiples componentes y compuestos celulares (Carol and Dolan, 2002; Mendrinna and Persson, 2015), como proteínas relacionadas con la pared celular, o factores de transcripción. En el grupo de proteínas de pared celular podemos incluir a MRH5, una proteína de anclaje a glicosil-fosfatidil inositol, similar a las glicerofosforil-diéster-fosfodiesterasa (GDP) (Hayashi et al., 2008) y a FLA6, una proteína arabinogalactano (AGPs), ambas necesarias para una correcta elongación del pelo. Además, es necesaria la acción conjunta de una serie de factores de transcripción, como RHD6, que controla el inicio del pelo radical (Grierson et al., 2014) o RSL4, diana directa de RHD6 y regulador del crecimiento polar de las células (Vijayakumar et al., 2016; Marzol et al., 2017).

Para analizar la expresión de los genes *MRH5*, *FLA6*, *RHD6* y *RSL4*, se recogieron raíces de plantas silvestres, así como mutantes simples y dobles, cultivadas durante 14 días en placas verticales de medio MSS. Se extrajo el RNA de estas muestras y posteriormente se obtuvo el cDNA con el que se realizaron las RT-PCRs en tiempo real.

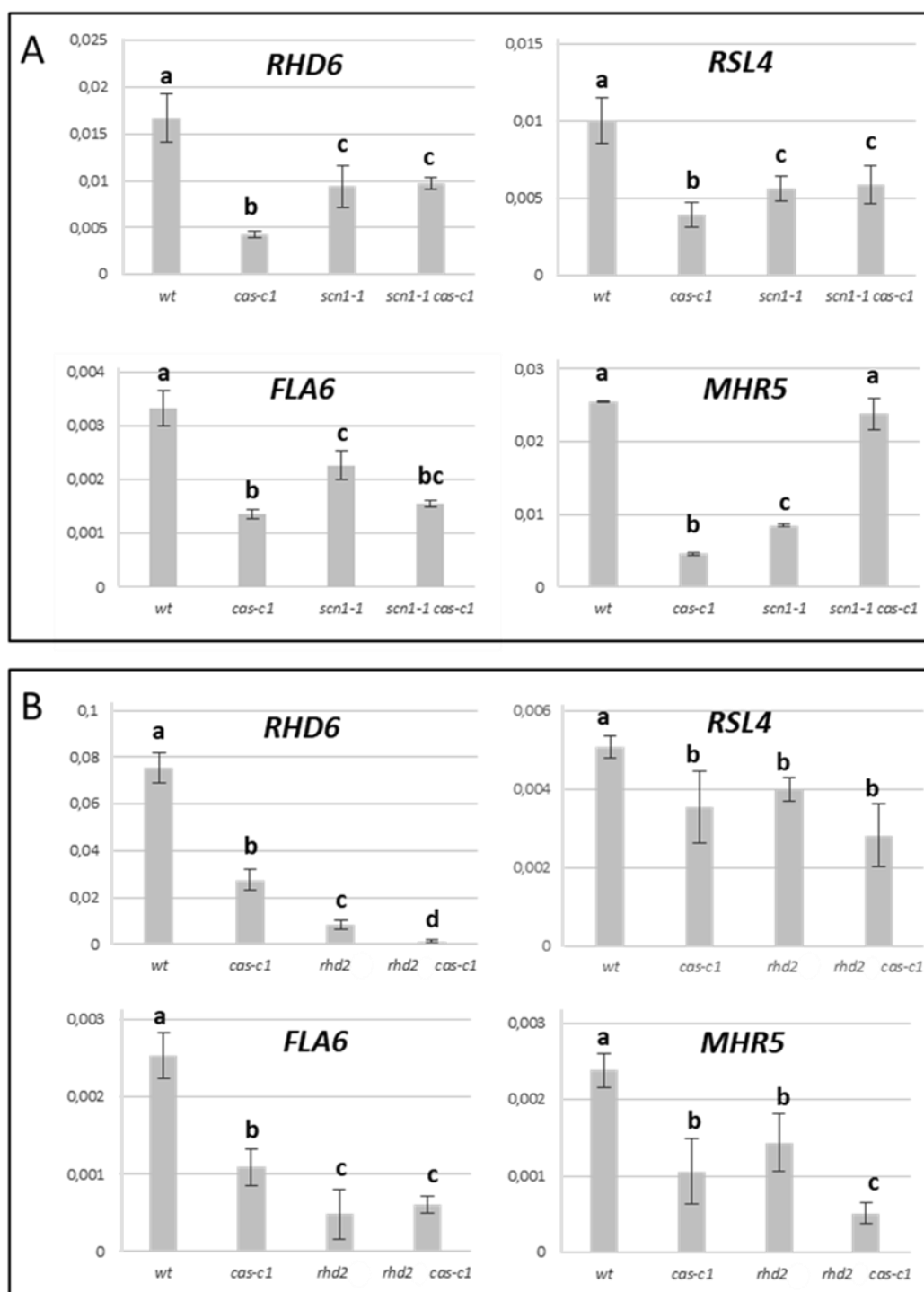


Figura 19. Análisis transcripcional de los genes *MHR5*, *FLA6*, *RHD6* y *RSL4*. Se realizó un análisis de expresión por RT-PCR en tiempo real en extractos de raíces de plantas silvestres, *cas-c1*, *scn1-1* y *scn1-1 cas-c1*, cultivadas 14 días en placas verticales de medio MSS (A), o plantas silvestres, *cas-c1*, *rh2* y *rh2 cas-c1*, cultivadas 14 días en placas verticales de medio MSS a pH 4 (B). Los niveles de transcrito se normalizaron con el gen constitutivo *UBQ10*. Los valores son medias \pm SD de tres determinaciones independientes. Las diferentes letras de las barras de error representan medidas significativamente diferentes (test ANOVA, $P < 0,01$).

Los resultados observados en la figura 19 muestran que la expresión de todos los genes analizados fue más baja en los mutantes *cas-c1*, *scn1-1* y *rh2*, comparados con la expresión en plantas silvestres. Cuando comparamos la expresión en los mutantes *scn1-1* con la de *scn1-1 cas-c1*, observamos que no hay una mayor represión de ninguno de los genes, a excepción de un leve descenso en los niveles de expresión de *FLA6* (Fig. 19A). La mutación *cas-c1*, por tanto, no afecta al comportamiento de *scn1-1* a nivel molecular. Estos resultados constatan de nuevo la relación de epistasia entre *scn1-1* y *cas-c1* propuesta anteriormente.

Por el contrario, al comparar *rh2* con *rh2 cas-c1*, observamos mayor represión en el caso del mutante doble que en el correspondiente parental en todos los genes analizados excepto *FLA6*, en el que los valores se mantienen estables (Fig. 19B). Esto confirma que la mutación *cas-c1* es epistática sobre *rh2*, también a nivel molecular.

1.2.5 Determinación de la actividad CAS y el contenido de cianuro

Se cuantificaron los niveles de cianuro en las raíces de todas las líneas tanto silvestre como mutantes (Fig. 20), así como los valores de actividad CAS (Fig. 21).

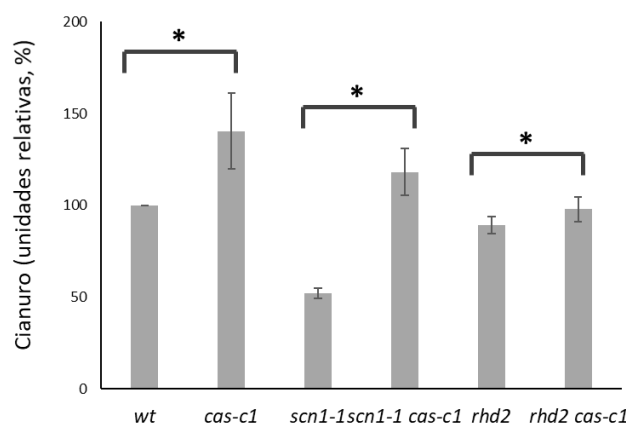


Figura 20. Determinación de la concentración de cianuro en raíces de los mutantes de desarrollo del pelo radical. Se recogieron las raíces de plantas silvestres, *cas-c1*, *scn1-1*, *scn1-1 cas-c1*, *rh2* y *rh2 cas-c1*, cultivadas durante 14 días en placas verticales de medio MSS. Los valores se han referido al contenido de cianuro de las plantas silvestres (el 100% de concentración corresponde a $0,58 \pm 0,01$ pmol/mg peso fresco) y son medias \pm SD de cinco determinaciones independientes (* $P < 0,05$).

En la figura 20 se aprecia que en todas las líneas en las que estaba presente la mutación *cas-c1*, existía un incremento en los niveles de cianuro, comparando la línea silvestre con la mutante *cas-c1* y las líneas dobles mutantes con las líneas mutantes simples correspondientes.

La acumulación de cianuro en las líneas *cas-c1*, *scn1-1 cas-c1* y *rh2 cas-c1* se correlaciona con una disminución de la actividad CAS (Fig. 21).

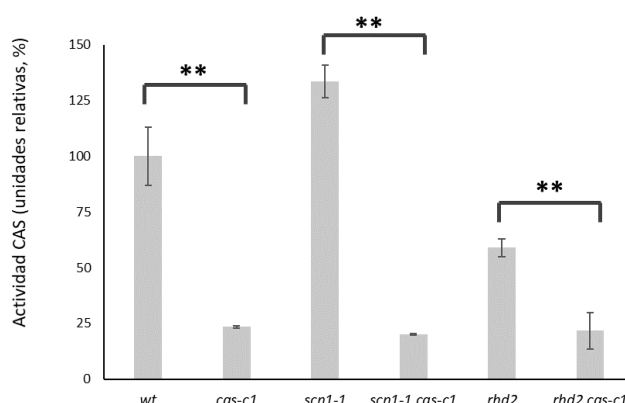


Figura 21. Determinación de los niveles de actividad CAS en raíces de los mutantes de desarrollo del pelo radical. Esta actividad se midió en extractos crudos de raíces de plantas silvestres, *cas-c1*, *scn1-1*, *scn1-1 cas-c1*, *rh2* y *rh2 cas-c1*, cultivadas durante 14 días en placas verticales de medio MSS. Los valores se han referido a la actividad determinada en las plantas silvestres (100% de actividad corresponde a $27,76 \pm 3,62$ U/mg proteína) y son medias \pm SD de cinco determinaciones independientes ($P^{***} < 0.01$)

1.2.6 Análisis fenotípico en presencia de ACC y determinación de los niveles de etileno

En *Arabidopsis*, el cianuro se produce en la ruta biosintética del etileno (Wang et al., 2002). La acumulación de cianuro en el mutante *cas-c1* podría inducir la represión de la síntesis de etileno, para así reducir los niveles de cianuro, creando un ciclo de retroalimentación negativa, que explicaría el fenotipo de ausencia de pelos radicales del mutante *cas-c1*. Para averiguar si el etileno está involucrado en el fenotipo presentado por *cas-c1*, se analizó el fenotipo de la raíz de estas líneas, en medio MS suplementado con el precursor del etileno ACC y se midieron los niveles de este compuesto en todas las líneas utilizadas en este trabajo, tanto silvestre como mutantes simples y dobles.

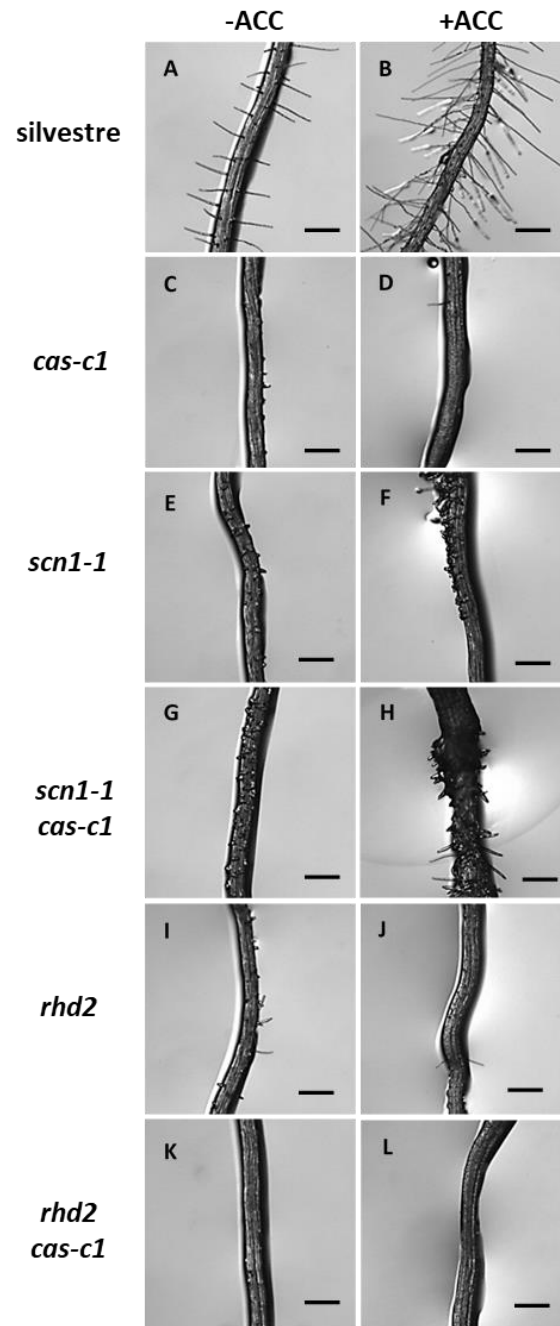


Figura 22. Efecto del ACC en la formación del pelo radical. (A, C, E, G, I, K) Fenotipo del pelo radical de plantas silvestres, *cas-c1*, *scn1-1*, *scn1-1cas-c1*, *rhd2* y *rhd2 cas-c1*, cultivadas durante 6 días en placas verticales de medio MSS en ausencia de ACC. (B, D, F, H, J, L) Fenotipo del pelo radical de plantas silvestres, *cas-c1*, *scn1-1*, *scn1-1cas-c1*, *rhd2* y *rhd2 cas-c1*, cultivadas durante 6 días en placas verticales de medio MSS en presencia de ACC 50 μ M. Escala = 25 μ m.

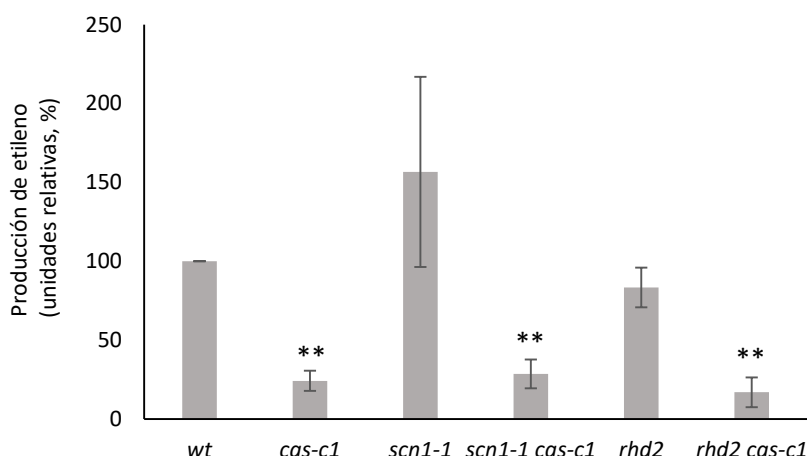


Figura 23. Producción de etileno en plantas silvestres y mutantes del desarrollo del pelo radical.

Se determinó la acumulación de etileno por cromatografía de gases en raíces de plantas silvestres, *cas-c1*, *scn1-1*, *scn1-1 cas-c1*, *rhd2* y *rhd2 cas-c1*, cultivadas durante 13 días en placas verticales de medio MSS. La acumulación de etileno se midió a las 24 horas posteriores al sellado de los viales. Los valores se han referido a la producción de etileno de las plantas silvestres (100 % de producción corresponde a $2,11 \pm 0,56$ pmol/mg peso fresco) y son medias \pm SD de cinco determinaciones por línea. ($P^{**} < 0.01$)

Como se había descrito anteriormente, el aporte exógeno de ACC en el medio de crecimiento no consigue revertir el fenotipo de pérdida de pelos radicales del mutante *cas-c1*, a pesar de que los niveles de etileno en las plantas mutantes *cas-c1* se reducían notoriamente (Fig. 22) (Garcia et al., 2010).

Se observa en la figura 23 que en las líneas mutantes *scn1-1 cas-c1* y *rhd2 cas-c1* también se reducen los niveles de etileno. A partir de estos datos podemos concluir que la mutación *cas-c1* provoca una reducción en los niveles de este compuesto, posiblemente para contrarrestar la acumulación de cianuro. Sin embargo, esta reducción en los niveles de etileno no es responsable del fenotipo de ninguna de las líneas analizadas ya que, al añadir ACC al medio de crecimiento no hay reversión del fenotipo de ninguno de los mutantes.

2. Caracterización del papel regulador del cianuro en el proceso de respuesta a la infección por patógenos

Resultados previos del grupo de investigación proponían un papel señalizador para el cianuro en el proceso de respuesta a la infección por patógenos en *A. thaliana* (Garcia et al., 2013). En primer lugar, se observó que la mutación de *cas-c1* provocaba resistencia a la infección por la bacteria hemibiótrofa *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*). Cuando se infectaron plantas

silvestres de *A. thaliana* con dos cepas de *Pst*, una virulenta (*Pst* DC3000) y otra avirulenta (*Pst* DC3000 *avrRpm1*), la cinética de acumulación de cianuro y, por tanto, la cinética de expresión del gen *cas-cl*, fueron diferentes en cada interacción. La cepa virulenta *Pst* DC3000 provoca una interacción compatible, desarrollando enfermedad en la planta. Por el contrario, la cepa avirulenta *Pst* DC3000 *avrRpm1* porta un plásmido con la proteína efectora AvrRpm1, que provoca una respuesta hipersensible y la consiguiente muerte celular. En la infección con *Pst* DC3000 *avrRpm1* se producía un pico de acumulación de cianuro a las 3 horas post infección (hpi), que se correspondía con una bajada transitoria de *CAS-C1*, para luego seguir aumentando. Por el contrario, en infecciones con *Pst* DC3000, los niveles de cianuro se mantenían notablemente más bajos que en el caso de la interacción incompatible y la transcripción de *CAS-C1* presentaba un pico de inducción a las 3 hpi que luego disminuía fuertemente (Garcia et al., 2013).

2.1 Análisis de la expresión de CAS-C1-GFP en infecciones con *P. syringae*

Para profundizar en el comportamiento de la proteína CAS-C1 durante las interacciones compatibles e incompatibles de *P. syringae* con plantas de *A. thaliana*, se llevó a cabo una aproximación celular. Para ello, se analizó mediante microscopía confocal la acumulación de fluorescencia de la proteína de fusión CASC1-GFP bajo el promotor del gen *CAS-C1* en hojas de plantas transgénicas que contenían la construcción *ProC1:CASC1-GFP* (ver apartado 1.1.1 de resultados), cultivadas durante 60 días en tierra y ciclo corto, e infectadas con cepas *Pst* DC3000 o *Pst* DC3000 *avrRpm1*. Como control (*mock*), se infectaron hojas con MgCl_2 10 mM estéril. Los datos de fluorescencia se obtuvieron a las 0, 1, 3, 6 y 24 hpi.

En la figura 24 se aprecia un punteado pequeño de color verde que, como ya se mostró en el apartado 1.1.2 de resultados, corresponde a la señal de la proteína de fusión CASC1-GFP en el interior de las mitocondrias. Durante las interacciones compatibles producidas por la cepa *Pst* DC3000 se produce un pico de fluorescencia entre 1 y 3 hpi, y un descenso a las 6 hpi. Por su parte, en las infecciones incompatibles con *Pst* DC3000 *avrRpm1* se produce una reducción de la fluorescencia a las 3 hpi y un aumento a las 6 hpi. Estos resultados están en concordancia con la cinética de acumulación de cianuro y transcrito de *CAS-C1* previamente descrita (Garcia et al., 2013), y reflejan nuevamente que la proteína CAS-C1 sufre una regulación diferente en infecciones que dan lugar a enfermedad e infecciones que originan una respuesta de resistencia. Estos resultados son compatibles con un papel regulador de CAS-C1 y/o cianuro en la respuesta

inmune de la planta, como ya se ha sugerido anteriormente (Garcia et al., 2013; Garcia et al., 2014).

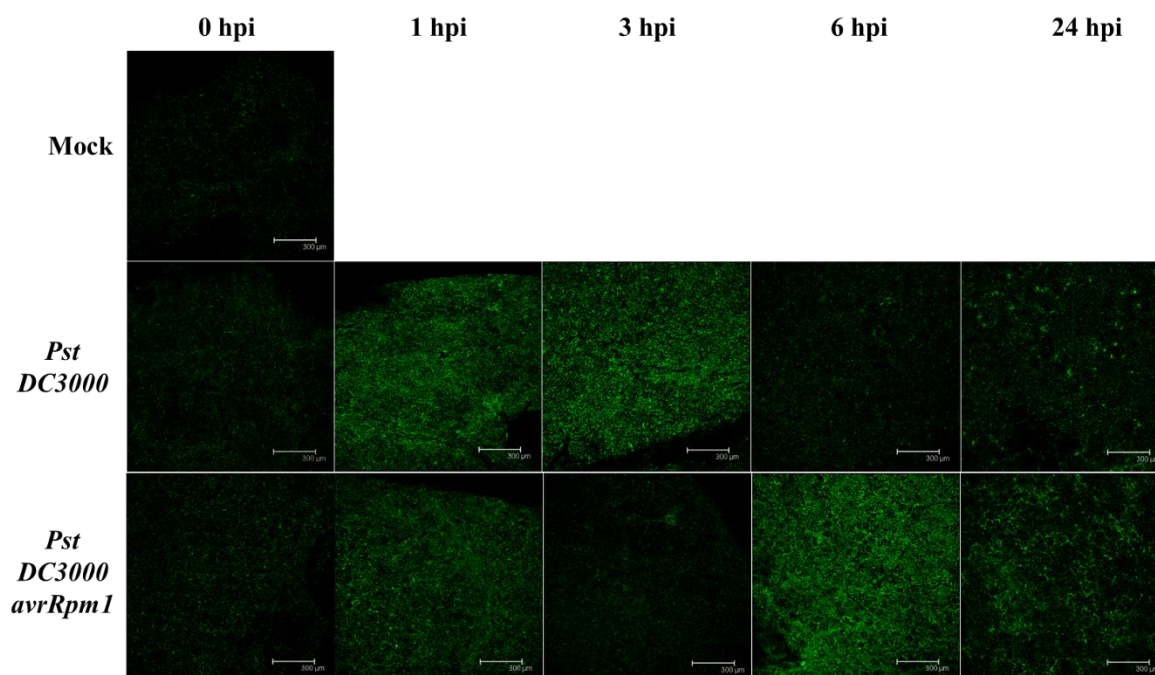


Figura 24. Infecciones con *P.syringae* en plantas *ProCI:CASCI-GFP*. Se inocularon mediante infiltración plantas *ProCI:CASCI-GFP* cultivadas durante 60 días en ciclo corto con suspensiones bacterianas de cepas *Pst* DC3000 o *Pst* DC3000 *avrRpm1*. La fluorescencia de la GFP se analizó al microscopio confocal a las 0, 1, 3, 6 y 24 hpi. Se muestran imágenes representativas. Escala = 300 μ m.

2.2 Caracterización de mutantes de respuesta a la infección por patógenos

2.2.1 Análisis transcripcional de los mutantes de respuesta a la infección por patógenos

Como se detalla en la introducción, la respuesta de una planta a la infección de un patógeno puede ser muy diversa y variada, implicando multitud de hormonas y componentes moleculares (Zhang et al., 2018). En el caso de los mutantes *cas-cl*, su fenotipo de resistencia a patógenos biótrofos y la activación transcripcional de *PR1* en ausencia de infección (Garcia et al., 2013) sugerían que la ruta de señalización de SA podría estar activada; por otra parte, el cianuro se produce de manera concomitante a la biosíntesis de ET. Por lo tanto, para profundizar en el papel del cianuro en el proceso de respuesta a patógenos en *A. thaliana*, se llevó a cabo un estudio transcripcional de genes centrales de la respuesta de las plantas mediada por SA y ET.

Como genes marcadores seleccionamos *ATRBOHD* que codifica una NADPH oxidasa responsable de la explosión oxidativa para la activación de la respuesta inmune dependiente de salicílico (Torres et al., 2006; Chaouch et al., 2012), y EIN2 que codifica una proteína de

membrana que actúa en la ruta de señalización dependiente de etileno (Zhao and Guo, 2011; Zhang et al., 2018).

Se analizó por RT-PCR la expresión de los genes *ATRBOHD* y *EIN2* en el mutante *cas-c1*, así como la expresión del gen *CAS-C1* en los mutantes *atrbohD3* y *ein2-1* y en plantas que expresaban el gen *nahG* bajo la dirección del promotor constitutivo CaMV35S (plantas NahG). Esta línea ha sido ampliamente utilizada como herramienta para el estudio de la respuesta dependiente de SA ya que *nahG* codifica la enzima salicilato hidroxilasa de la bacteria *Pseudomonas putida* y metaboliza el ácido salicílico hasta catecol y por lo tanto anula la respuesta mediada por SA (Yamamoto et al., 1965; Zhang et al., 2018). Se recogieron hojas de plantas silvestres y mutantes cultivadas durante 60 días en tierra y ciclo corto y se extrajo el RNA para el análisis cuantitativo.

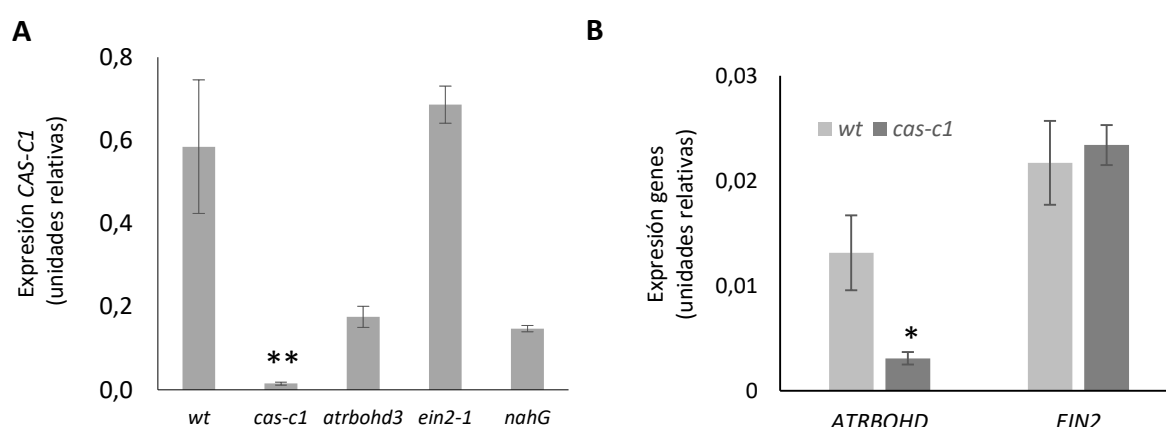


Figura 25. Análisis transcripcional de los genes de respuesta a la infección por patógenos. (A) Análisis de expresión por RT-PCR en tiempo real del gen *CAS-C1* en hojas de plantas silvestres, *cas-c1*, *atrbohD*, *ein2-1* y NahG, cultivadas en tierra durante 60 días en ciclo corto. (B) Análisis de expresión por RT-PCR en tiempo real de los genes *ATRBOHD* y *EIN2* en hojas de plantas silvestres y mutante *cas-c1*, cultivadas en tierra durante 60 días en ciclo corto. Los niveles de transcrito se normalizaron con el gen constitutivo *UBQ10*. Los valores son las medias \pm SD de tres determinaciones independientes. ($P^* < 0,05$, $P^{**} < 0,01$).

Como ya se observó previamente en el análisis de expresión de genes de desarrollo del pelo radical (Fig. 15), la expresión de *CAS-C1* en el mutante *cas-c1* es prácticamente nula. La expresión de *CAS-C1* está reducida en los mutantes *atrbohD3* y las plantas NahG (Fig. 25A). Del mismo modo, se produce una reducción en los niveles de transcrito del gen *ATRBOHD* en el mutante *cas-c1* (Fig. 25B). Esto indica que existe una interacción entre el cianuro y la ruta de respuesta a patógenos dependiente de ácido salicílico. Este resultado concuerda con el

aumento de la resistencia a patógenos biótrosos observada en el mutante *cas-c1* (García et al. 2013).

Por el contrario, ni la expresión de *CAS-C1* en el mutante *ein2-1* ni la de *EIN2* en el mutante *cas-c1* experimentan ninguna variación estadísticamente significativa (Fig. 25A y 25B), sugiriendo que el papel del cianuro en la respuesta a patógenos podría ser independiente de la ruta de señalización del etileno. Por lo tanto, se continuó profundizando en la relación entre el cianuro y la ruta de señalización dependiente de SA.

2.2.2 Respuesta de los dobles mutantes *atrbohD3 cas-c1* y *NahG cas-c1* a la infección con *P. syringae*

Para conocer en qué etapa de la ruta de respuesta a la infección por patógenos dependiente de ácido salicílico está actuando el cianuro, se realizaron cruces de las líneas *atrbohD3* y *NahG* con la línea *cas-c1*, generándose las líneas mutantes dobles *atrbohD3 cas-c1* y *NahG cas-c1*. Las plantas silvestres, así como los mutantes simples y dobles se cultivaron durante 60 días en tierra y ciclo corto y se inocularon las hojas con suspensiones bacterianas de la cepa *Pst* DC3000. Se tomaron muestras de hojas a los 0, 1 y 3 días post infección (dpi) y se realizaron medidas de crecimiento bacteriano a partir de hojas infectadas.

Tanto en la figura 26A como en la 26B observamos que el recuento de colonias (cfu) en la línea mutante *cas-c1* es menor que en las plantas silvestres. Esto significa que, como se describió anteriormente (García et al., 2013), las plantas mutantes *cas-c1* son más resistentes a la infección con el patógeno biótrofo *P. syringae*. Sin embargo, el mutante *atrbohD3* muestra mayor susceptibilidad que las plantas silvestres, debido a que esta mutación compromete la producción de ROS por parte de la NADPH oxidasa y por tanto la planta no es capaz de llevar a cabo una correcta activación de las defensas dependientes de SA. Sorprendentemente, en el mutante doble *atrbohD3 cas-c1* el recuento de colonias fue notablemente menor que en su parental *atrbohD3* y similar al de la línea silvestre (Fig. 26A), lo que significa que la acumulación de cianuro debida a la mutación *cas-c1* es capaz de mimetizar o reemplazar el efecto de las ROS producidas por la NADPH oxidasa en la activación de las defensas de la planta.

En la figura 26B observamos que tanto la línea sobreexpresora *NahG* como la línea mutante doble *NahG cas-c1* muestran una mayor susceptibilidad a la infección con *P. syringae*. Esto se

debe a que la enzima salicilato hidroxilasa degrada el ácido salicílico hasta catecol, limitando así la cascada de señalización de esta respuesta mediada por SA. Estos resultados indican que el cianuro mejora la resistencia de *cas-c1* a *Pst* DC3000 de una manera dependiente de la producción de SA. Como conclusión a esta parte del trabajo, podemos decir que el cianuro es capaz de mimetizar el efecto de la producción de ROS por la NADPH oxidasa en la respuesta defensiva de la planta pero no el del SA. Estos resultados confirman, además, que el aumento en la resistencia a patógenos biótrosos observado en el mutante *cas-c1* depende de la acumulación de SA.

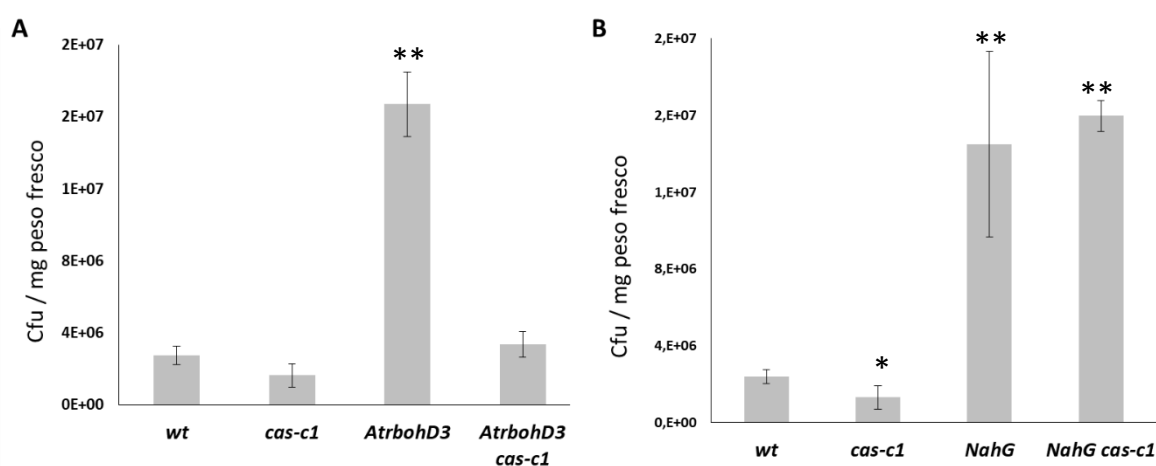


Figura 26. Susceptibilidad a la infección con *Pst* DC3000. (A) Se infectaron hojas de plantas silvestres y mutantes *cas-c1*, *atrbohD3* y *atrbohD3 cas-c1* cultivadas durante 60 días en ciclo corto con cepas *Pst* DC3000 y se realizó el recuento de colonias (cfu/mg peso fresco) a los 3 dpi. (B) Se infectaron hojas de plantas silvestres y mutantes *cas-c1*, *NahG* y *NahG cas-c1* cultivadas durante 60 días en ciclo corto con cepas *Pst* DC3000 y se realizó el recuento de colonias (cfu/mg peso fresco) a los 3 dpi. Se llevaron a cabo 5 réplicas experimentales para cada muestra, así como 4 réplicas técnicas, con resultados similares en todos los casos. Los valores son medias \pm SD de un ensayo representativo. ($P^* < 0,05$, $P^{**} < 0,01$).

2.2.3 Hipersensibilidad de *cas-c1* al ácido salicílico

Como se ha detallado anteriormente, el ácido salicílico es un regulador clave de la ruta de respuesta a patógenos biótrosos. Cuando plantas silvestres y mutantes *cas-c1* cultivadas durante 60 días en ciclo corto se sometieron a tratamientos con SA 0,5 mM, se observó una hipersensibilidad del mutante *cas-c1* al SA, ya que a las 24 h tras el tratamiento las plantas mutantes tratadas presentaban síntomas de amarillamiento, pérdida de turgor y un colapso parcial de la hoja que no se apreciaba en las plantas silvestres (Fig. 27).

Como se demuestra en el apartado anterior, el mutante *cas-c1* presenta una mayor resistencia al ataque de patógenos biótrofos, por tanto, esta ruta debe tener unos niveles de activación mayores que en las plantas silvestres. En las plantas *cas-c1*, el tratamiento con SA podría estar produciendo una sobreactivación de la respuesta dependiente de SA, y una sobreactivación por tanto, de la muerte celular, razón por la cual estas plantas podrían desarrollar hipersensibilidad al SA.

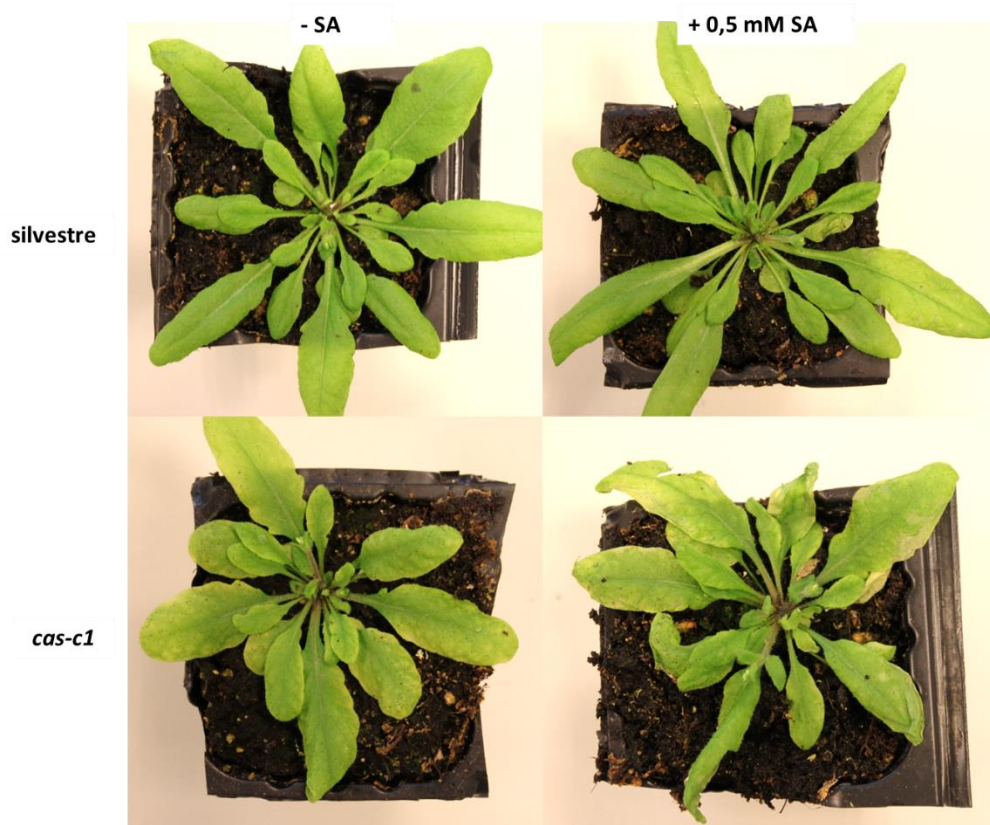


Figura 27. Hipersensibilidad del mutante *cas-c1* al ácido salicílico. Las plantas silvestres y mutantes *cas-c1* crecieron durante 60 días en ciclo corto y se les aplicó un tratamiento con ácido salicílico 0,5 mM en spray. Como control, se realizó el mismo tratamiento con H₂O destilada. Tras 24 horas se tomaron fotos de los fenotipos de las plantas tratadas y sin tratar.

2.2.4 Cuantificación de los niveles de ácido salicílico

Para profundizar en la regulación hormonal y dado que los resultados sugieren una interacción entre el cianuro y la ruta de respuesta a patógenos dependiente de ácido salicílico, se determinaron los niveles de esta hormona en plantas silvestres y mutantes *cas-c1*, *atrbohD3* y *atrbohD3 cas-c1* cultivadas durante 60 días en tierra y ciclo corto. Estas determinaciones se realizaron en el servicio de cuantificación de hormonas vegetales del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, Valencia).

Como se observa en la figura 28, los niveles de ácido salicílico son menores tanto en el mutante simple *atrbohD3* como en el doble *atrbohD3 cas-c1*, apreciándose una reducción no estadísticamente significativa en el mutante *cas-c1*. En el mutante *atrbohD3*, la cantidad de SA necesaria para la correcta activación de la respuesta de defensa disminuye, ya que la producción de ROS por parte de la NADPH oxidasa se encuentra comprometida. La combinación de la mutación *cas-c1* y *atrbohD3* hace que los niveles de SA en el doble mutante sean prácticamente nulos, a pesar de que estos mutantes son más resistentes a *Pseudomonas* que su parental *atrbohD3*.

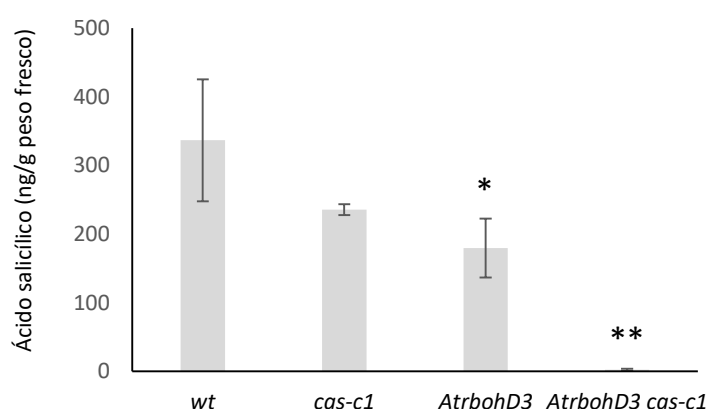


Figura 28. Determinación de ácido salicílico en los mutantes de respuesta a patógenos. (A) Se midieron los niveles de ácido salicílico en hojas de plantas silvestres, *cas-c1*, *atrbohD3* y *atrbohD3 cas-c1* cultivadas durante 60 días en ciclo corto. Los valores son medias \pm SD de tres determinaciones independientes ($P^* < 0,05$, $P^{**} < 0,01$).

2.3 Regulación por cianuro de la proteína NPR1

Como se detalla en la introducción, la proteína NPR1 es un regulador central de la ruta de señalización frente a patógenos biótrosos dependiente de SA. Ante la infección de un patógeno biótrofo, NPR1 monomeriza y entra al núcleo, donde interacciona con los factores de transcripción TGA que activan los genes de defensa (Fu and Dong, 2013).

Para averiguar si el papel regulador del cianuro en la respuesta a la infección por patógenos biótrosos es dependiente de la proteína NPR1, se utilizaron dos aproximaciones diferentes: se analizó la localización nuclear de esta proteína mediante microscopía confocal, y se cuantificaron los niveles de las formas monoméricas y oligoméricas de NPR1 por inmunodetección en diferentes condiciones y estadios.

2.3.1 Estudio de la expresión espacio-temporal de la proteína NPR1

Se analizó la expresión y localización subcelular de la proteína NPR1 mediante microscopía confocal. Para ello se utilizó la construcción *2x35S:NPR1-GFP*, cedida por el Dr. Jose L. Pruneda-Paz, de la Universidad de California, Estados Unidos. Esta construcción consta de un promotor constitutivo *2x35S*, que dirige la expresión de la ORF de la proteína NPR1 fusionada traducionalmente a la proteína reportera GFP en el extremo carboxilo terminal. Se obtuvieron varias líneas transgénicas, que fueron analizadas al microscopio confocal para seleccionar aquellas que presentaran fluorescencia en los núcleos debido a la monomerización y traslocación al núcleo de NPR1-GFP tras los tratamientos con SA (Fig. 29).

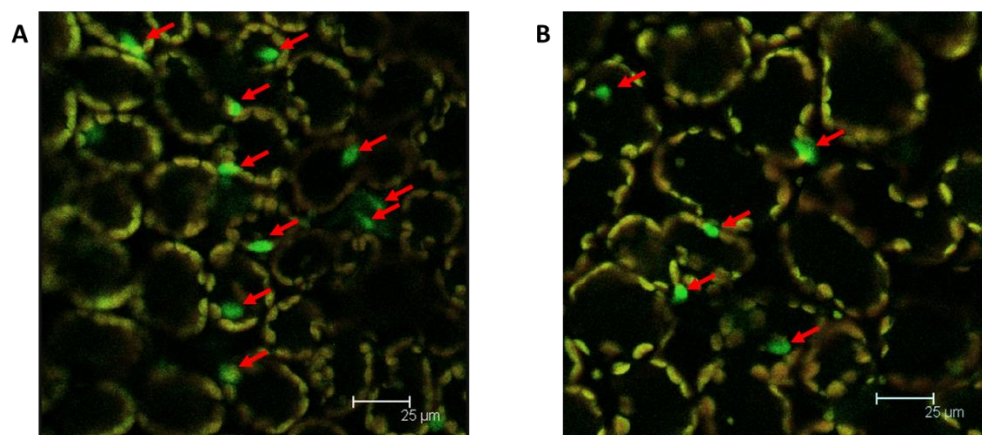


Figura 29. Selección de líneas positivas para la construcción *2x35S:NPR1-GFP*. Con objeto de seleccionar las líneas transformantes positivas para la construcción *2x35S:NPR1-GFP*, se realizaron pulverizaciones con SA 0,5 mM en plantas transformadas con dicha construcción y cultivadas durante 35 días en tierra. Tras 24 h, se observaron al microscopio confocal. Se muestran imágenes representativas A) línea 3 B) línea 10. Escala = 25 μm.

Las dos líneas silvestres positivas seleccionadas (líneas 3 y 10) se cruzaron con las plantas mutantes *cas-c1* y las semillas resultantes (F_1) se propagaron hasta conseguir plantas homocigotas para la mutación *cas-c1* que portaran la construcción *2x35S:NPR1-GFP* en el mismo *locus* que las plantas silvestres. La localización subcelular de la proteína de fusión NPR1-GFP se analizó entonces en el microscopio confocal en los fondos genéticos silvestre y *cas-c1* (plantas wt-NPR1:GFP y *cas-c1*-NPR1:GFP, respectivamente).

En la figura 30 observamos la fluorescencia de la GFP dirigida por el promotor y la secuencia de la proteína NPR1 en los núcleos celulares (puntos verdes señalados con flechas rojas). Tanto en ciclo largo (Fig. 30A) como en ciclo corto (Fig. 30B) así como sin o con SA, observamos que las plantas mutantes *cas-cl* presentan un menor número de núcleos fluorescentes que las plantas silvestres, es decir, en estas plantas hay una menor proporción de proteína NPR1 monomérica y, por lo tanto, funcional en el núcleo. Estos resultados parecen indicar que el aumento de la resistencia de *cas-cl* a la infección por patógenos biótrosos es independiente de un incremento en la localización nuclear de la proteína NPR1.

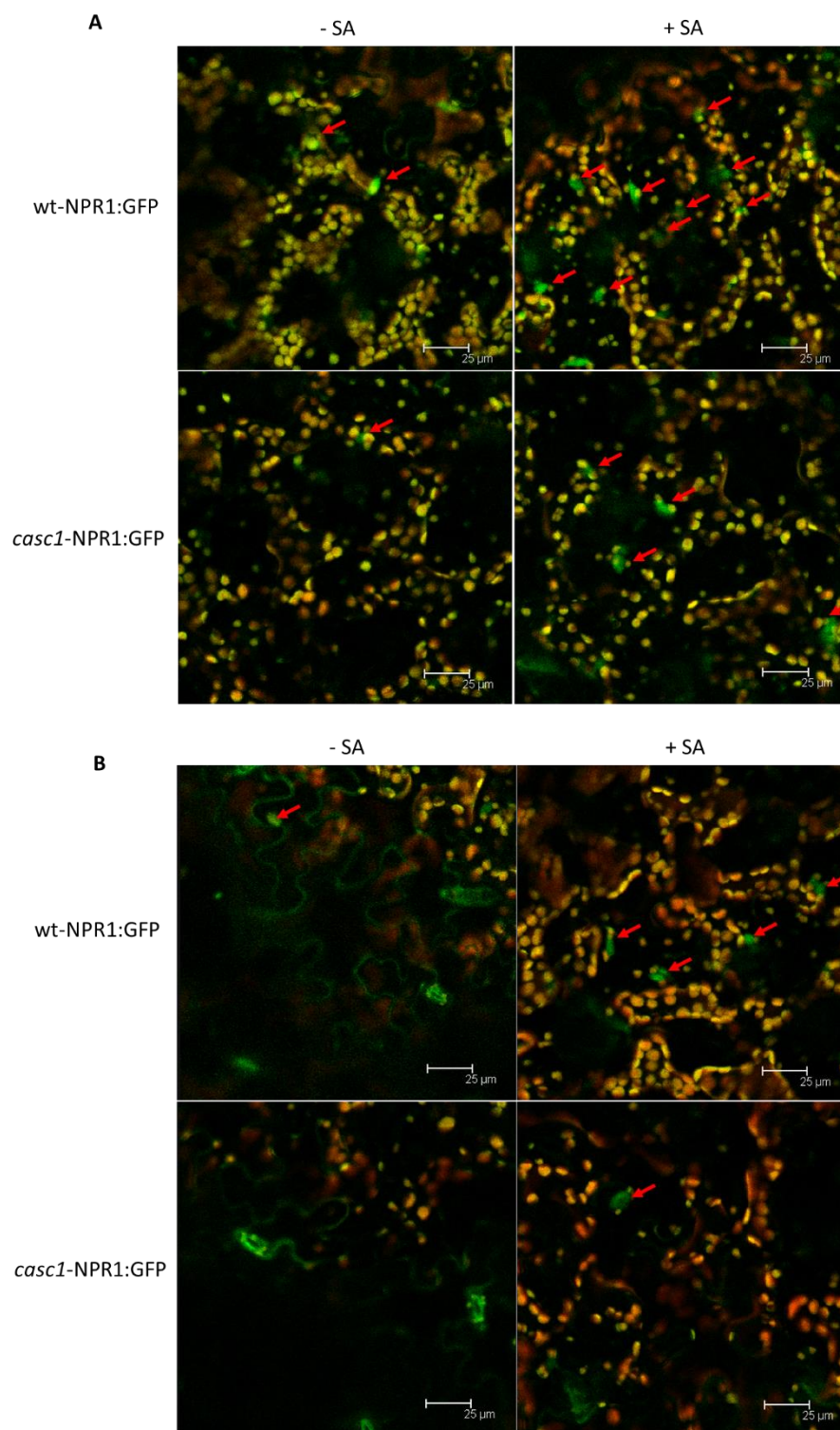


Figura 30. Expresión de NPR1 en hojas de plantas silvestres y mutantes *cas-c1* transformadas con *2x35S:NPR1-GFP*. Se trataron plantas wt-NPR1:GFP y *casc1*-NPR1:GFP cultivadas durante 35 días (ciclo largo, A) o 60 días (ciclo corto, B) con SA 0,5 mM en spray. Tras 24 h se observaron las hojas al microscopio confocal. Se muestran imágenes representativas de la fluorescencia de la GFP dirigida por el promotor y la secuencia de NPR1 (verde) y la autofluorescencia de los cloroplastos (rojo). Los núcleos celulares con fluorescencia se indican con flechas de color rojo. Escala = 25 μm.

2.3.2 Inmunodetección de NPR1

Una aproximación complementaria a la anterior para establecer la relación entre monomerización y entrada al núcleo de NPR1 con la resistencia de las plantas *cas-c1* a *P. syringae* fue el uso de anticuerpos policlonales anti-NPR1 para la inmunodetección de NPR1. Para ello, se realizaron extracciones proteicas en presencia de varios detergentes para romper las membranas celulares y del inhibidor del proteasoma MG132 para evitar la degradación de NPR1, tal como se describe en materiales y métodos. Se detectaron y cuantificaron los niveles de NPR1 por inmunodetección en hojas de plantas silvestres y mutantes *cas-c1* transformadas con la construcción *2x35S:NPR1-GFP* (plantas wt-NPR1:GFP y *cas-c1*-NPR1:GFP, respectivamente) y cultivadas en ciclo largo o ciclo corto (Figura 31). Se analizaron y cuantificaron las bandas correspondientes al monómero de la proteína endógena (66 kDa; M), así como los oligómeros correspondientes a la proteína de fusión (OF) y la endógena (O).

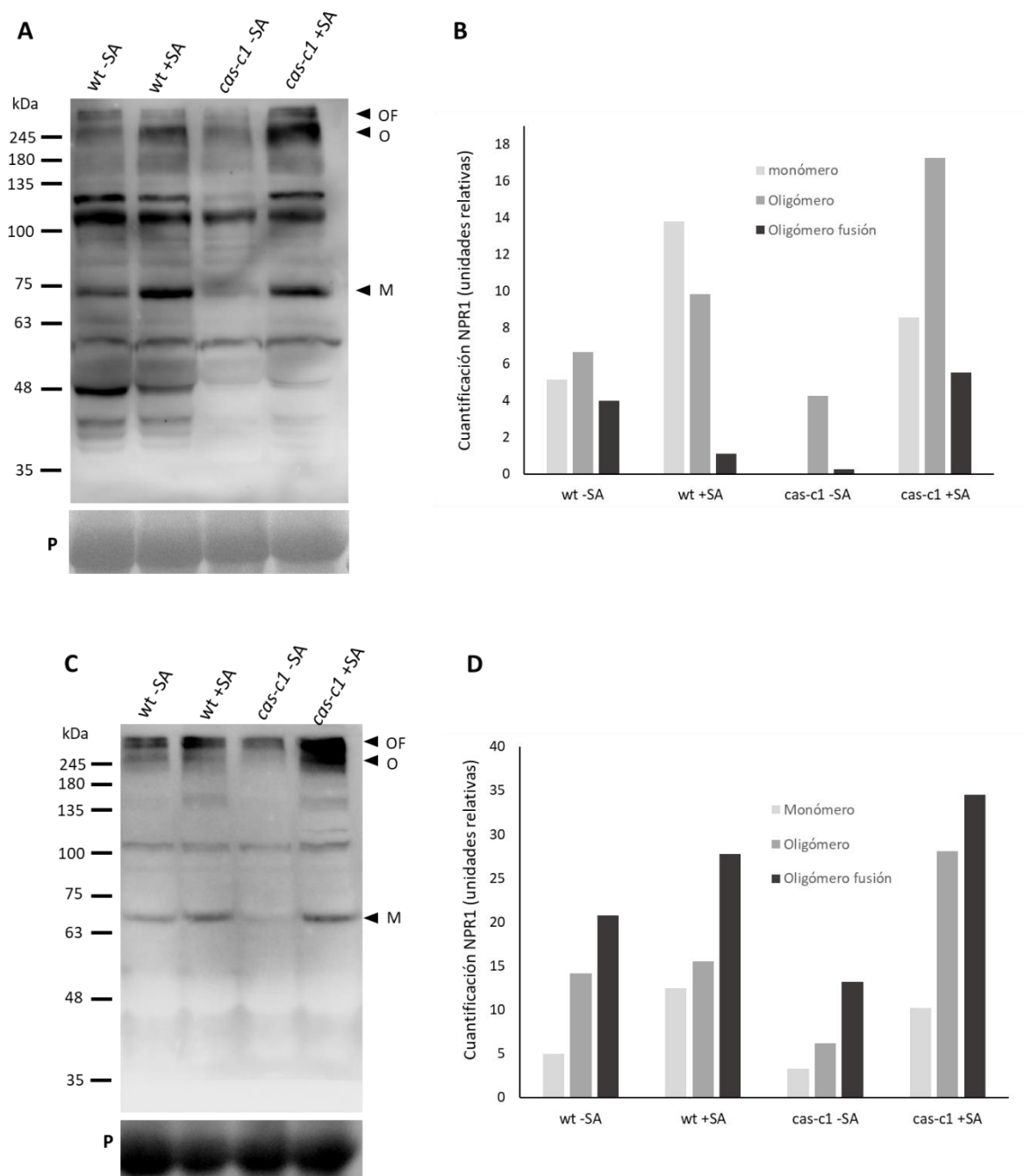


Figura 31. Inmunodetección de NPR1 en líneas transformadas con $2 \times 35S:NPR1-GFP$. Se realizó una extracción proteica de hojas de plantas transformadas silvestres y mutantes *cas-c1* cultivadas durante 28 días en ciclo largo (A) o 60 días en ciclo corto (C), tratadas y sin tratar con SA 0,5 mM. 50 μ g de proteína total se desnaturalizaron con DTT 50 mM, se separaron por SDS-PAGE en geles al 8%. Finalmente, se inmunodetectó la proteína NPR1 y se cuantificó la intensidad de las bandas obtenidas en un gel representativo con el software “Image Lab” (BioRad) refiriendo a la cantidad de proteína total detectada mediante la tinción *Ponceau* (B, D). M, monómero; O, oligómero; OF, oligómero de fusión; P, Ponceau.

En las condiciones utilizadas, fue imposible detectar el monómero correspondiente a la proteína quimérica NPR1-GFP (Fig. 31). A las 24 horas, se observa que el tratamiento con ácido

salicílico 0,5 mM estabiliza la proteína en todas sus formas, monomérica y oligomérica, tanto en las plantas silvestres como en las plantas mutantes *cas-c1*, incrementando por lo tanto los niveles de proteína NPR1. Las causas de esta estabilización son variadas y, por ejemplo, se ha demostrado que el SA reprime la degradación de NPR1 por parte de sus análogos NPR3 y NPR4 (Ding et al., 2018). Además, el tratamiento con SA induce la monomerización de la proteína, como se observa en el aumento de la forma monomérica (M) en plantas silvestres y mutantes. Finalmente, el anticuerpo detecta otras bandas inespecíficas que presentan pesos moleculares diferentes a los descritos para las diferentes isoformas de la proteína NPR1 y que están descritas, además, en la información sobre el anticuerpo recogida por la casa comercial.

De igual manera que se observó en el análisis de expresión de la proteína NPR1 mediante microscopía confocal, en todas las condiciones, tanto en ciclo largo como ciclo corto, como con o sin salicílico, la cantidad de proteína NPR1 monomérica detectada es menor en el mutante *cas-c1* que en las plantas silvestres. Confirmamos de nuevo que la resistencia de *cas-c1* a la infección por patógenos biótrosos no se debe a la monomerización y entrada en el núcleo de NPR1.

En cuanto al comportamiento del oligómero de NPR1, se observa que en condiciones basales (-SA), la cantidad de proteína NPR1 oligomérica es menor en las plantas *cas-c1* que en las plantas silvestres, como ocurre con el monómero. Sin embargo, tras el tratamiento (+SA), la cantidad de oligómero detectado, tanto endógeno como de fusión, es más elevada en las plantas *cas-c1* que en las plantas silvestres, lo que podría indicar que las plantas mutantes *cas-c1* responden más eficazmente al SA.

Los resultados presentados en esta parte del trabajo podrían indicar que el cianuro mimetiza la función productora de ROS de la NADPH oxidasa (ATRBOHD) y modula la respuesta a la infección por patógenos biótrosos de una forma dependiente de la acumulación de SA e independiente de la función de la proteína NPR1. Las posibles rutas y proteínas a través de las cuales el cianuro modula la respuesta a patógenos biótrosos aún necesitan ser esclarecidas.

3. Mecanismo de acción del cianuro

Como se ha mostrado anteriormente, el cianuro ejerce un papel señalizador en el proceso de formación del pelo radical y la respuesta a la infección por patógenos biótrosos en *Arabidopsis*. Sin embargo, se desconocen el o los mecanismos de acción del cianuro así como sus dianas

moleculares. No cabe duda de que estos mecanismos de acción deben de estar relacionados con su reactividad química. Por analogía con otras moléculas señalizadoras con reactividad similar, serían posibles al menos dos mecanismos basados en su capacidad de reaccionar con metaloproteínas y/o generar modificaciones post-traduccionales en proteínas. La reacción con el centro activo de las metaloproteínas por un lado, tendría un impacto directo en la energética celular por afectar las cadenas de transporte de electrones y, por otro, alteraría los niveles de especies reactivas de oxígeno. (Fig. 32).

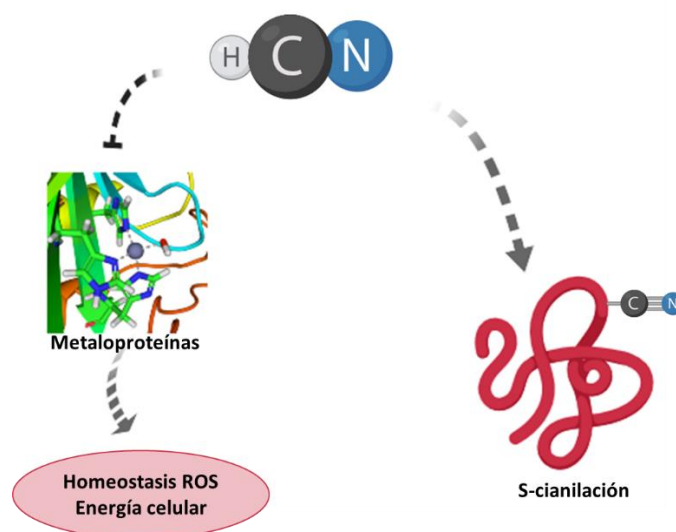


Figura 32. Posibles mecanismos de acción del cianuro

3.1 Efecto del cianuro en la energía celular

El cianuro es un potente inhibidor de la cadena de electrones mitocondrial y la elongación del pelo radical es un proceso muy costoso energéticamente. Para analizar si el efecto del cianuro en el proceso de desarrollo del pelo radical es consecuencia de la inhibición de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y la reducción de los niveles de ATP y la energía requerida para el rápido crecimiento del pelo. Se determinaron los niveles de ATP en plantas silvestres y mutantes *cas-cl* cultivadas durante 14 días en placas de medio MSS.

Según los resultados obtenidos en la tabla 7, los niveles de ATP en las plantas mutantes *cas-cl* son similares a los de las plantas silvestres. Este resultado, junto con datos anteriores del grupo que mostraban que la respiración no se encuentra disminuida en este mutante (Garcia et al., 2010), demuestran que el fenotipo de las plantas *cas-cl* no se debe a una limitación de energía

celular resultante de la conocida acción inhibidora del cianuro en la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

Tabla 7. Niveles de ATP en raíces de *A. thaliana*. Se determinaron los niveles de ATP de raíces de plantas silvestres y mutantes *cas-c1* cultivadas durante 14 d en placas verticales de medio MSS. Los valores son medias \pm SD de tres ensayos independientes.

<u>Línea</u>	<u>ATP (nM)</u>
Silvestre	400.9 \pm 118.6
<i>cas-c1</i>	427.6 \pm 118.2

3.2 Efecto del cianuro en el estado redox

Para comprobar si el cianuro regula la formación del pelo radical modificando el estado redox de la célula, se analizaron los niveles de anión superóxido y de peróxido de hidrógeno y se determinaron las actividades NADPH oxidasa y guaiacol peroxidasa en diferentes fondos genéticos.

3.2.1 Anión superóxido (O_2^-)

La producción de ROS por parte la NADPH oxidasa ATRBOHC/Rhd2 durante el proceso de desarrollo del pelo radical es indispensable para su correcta formación (Mendrinna and Persson, 2015). Para analizar si el cianuro regula el desarrollo del pelo radical modulando la respuesta oxidativa, se realizaron tinciones en plantas silvestres y mutantes cultivadas durante 3 días en placas de medio MSS, con nitroazul de tetrazolio (NBT), un colorante que tiñe específicamente el anión superóxido (O_2^-).

Los resultados de la figura 33 muestran que los pelos radicales del mutante *cas-c1* no acumulan O_2^- en la punta (Fig. 33B) como ocurre en los pelos radicales de plantas silvestres (Fig. 33A). Tampoco se aprecia acumulación de O_2^- en el mutante *rhd2* (Fig. 33E) debido a la mutación de la NADPH oxidasa, por lo que resulta obvio que el doble mutante *rhd2 cas-c1* tampoco presente tinción (Fig. 33F). Sin embargo, los mutantes *scn1-1* y *scn1-1 cas-c1* presentan tinción

con NBT repartida por toda la superficie del pelo, y no concentrada en la punta (Fig. 33C y 33D). Eso se debe a que la mutación *scn1-1* no permite la localización dirigida a la punta del pelo radical de la NADPH oxidasa y por lo tanto la producción de aniones superóxido se encuentra deslocalizada. Además, estos resultados sugieren que la NADPH oxidasa no es sensible al cianuro ya que el O_2^- se acumula tanto en *scn1-1* como en mutante doble *scn1-1 cas-c1*, a pesar de que este último acumula más cianuro que *scn1-1* (Fig. 20).

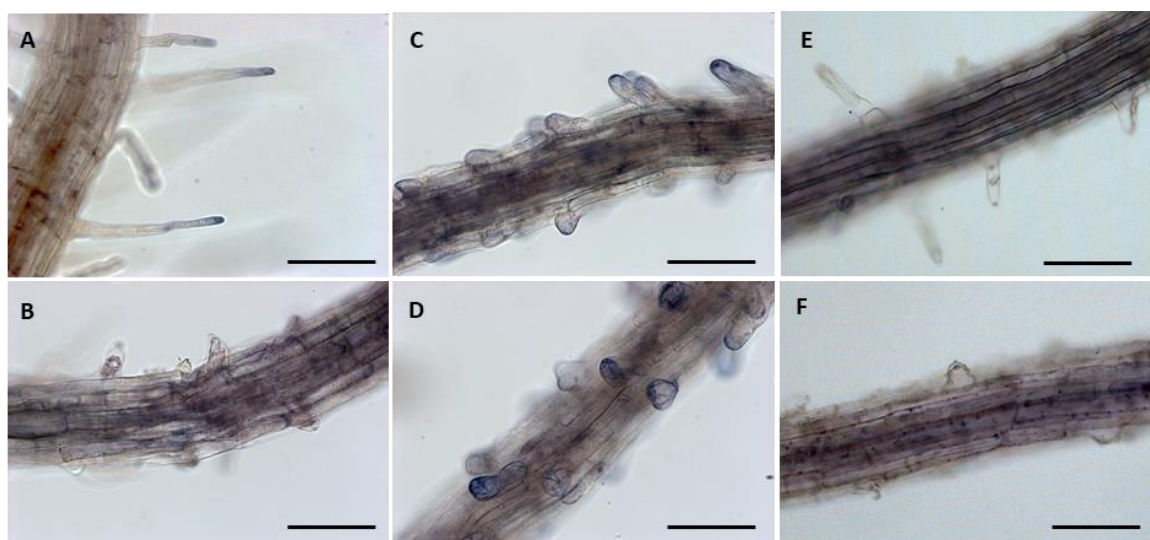


Figura 33. Detección de O_2^- en raíces de *A. thaliana*. Se cultivaron plántulas silvestres (A), *cas-c1* (B), *scn1-1* (C), *scn1-1 cas-c1* (D), *rhd2* (E) y *rhd2 cas-c1* (F) durante 3 días en placas verticales de medio MSS y las raíces se tiñeron con el colorante NBT. Se muestran imágenes representativas. Los ensayos se llevaron a cabo tres veces, con resultados similares en todas las ocasiones. Escala = 0,1 mm.

3.2.2 Peróxido de hidrógeno

A pesar de que el anión superóxido es fácilmente convertible a H_2O_2 , estas dos ROS presentan una distribución y funciones diferentes (Sundaravelpandian et al., 2013). Así pues, también se realizaron tinciones en plantas silvestres y mutantes de desarrollo del pelo radical cultivadas durante 14 días en placas de medio MSS con diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA), un compuesto que reacciona específicamente el H_2O_2 .

En la figura 34 observamos que los mutantes *cas-c1* y *scn1-1 cas-c1* presentan mayor acumulación de H_2O_2 en la zona de elongación de la raíz que las plantas silvestres y el mutante simple *scn1-1*. No se observa, sin embargo, acumulación de fluorescencia en los pelos radicales. Los mutantes *rhd2* y *rhd2 cas-c1* no presentan acumulación de H_2O_2 en la zona de

elongación de la raíz. Esto sugiere que el efecto del cianuro en el desarrollo del pelo radical es independiente de la producción de ROS ya que, a pesar de que el mutante doble *rhb2 cas-c1* presenta un claro fenotipo *cas-c1*, no se produce acumulación de H_2O_2 .

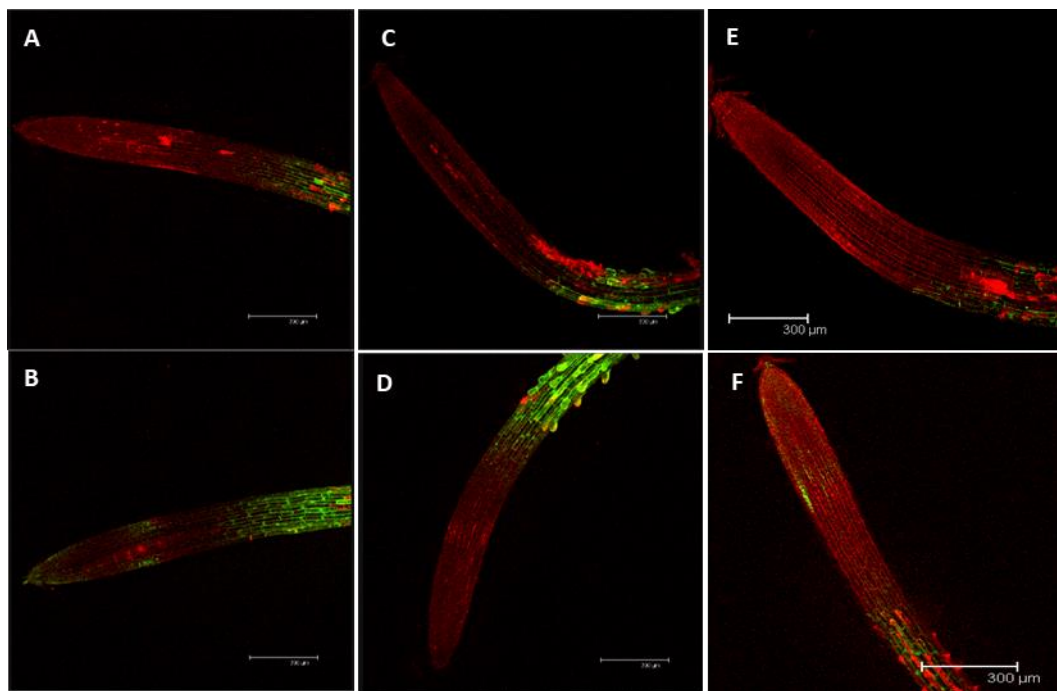


Figura 34. Detección de H_2O_2 en raíces de *A. thaliana*. El H_2O_2 se detectó mediante tinción H_2DCFDA en raíces de plantas cultivadas durante 14 días en placas verticales de medio MSS. (A) Silvestre, (B) *cas-c1*, (C) *scn1-1*, (D) *scn1-1 cas-c1*, (E) *rhb2* y (F) *rhb2 cas-c1*. Se muestran imágenes representativas. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, con resultados similares. Escala = 300 μm .

3.2.3 Actividad NADPH oxidasa

Para determinar si la actividad NADPH oxidasa se inhibe por cianuro, se midieron los niveles de actividad NADPH oxidasa en raíces de plantas silvestres con y sin tratamientos previos del extracto proteico con cianuro de potasio (KCN) durante 30 minutos, así como en plantas mutantes *cas-c1*.

La actividad NADPH oxidasa permaneció invariable tanto en presencia como en ausencia de KCN. Además, tampoco varió en el fondo genético mutante *cas-c1* con respecto al silvestre (Tabla 8). Esta información, junto con los resultados obtenidos en el apartado anterior, demuestran que el cianuro no afecta la actividad de la proteína NADPH oxidasa.

Tabla 8. Determinación de la actividad NADPH oxidasa en raíces de *A. thaliana*. Se determinó la actividad en extractos proteicos totales con o sin tratamiento previo con KCN 0,1 mM durante 30 min. Se utilizaron raíces de plantas silvestres y mutantes *cas-cl* cultivadas durante 14 días en placas verticales con medio MSS. Los valores son medias \pm SD de tres ensayos independientes.

Línea	Actividad NADPH oxidasa (mU/ μ g)
Silvestre	23,23 \pm 2,8
<i>cas-cl</i>	20,64 \pm 0,6
silvestre + KCN 0,1mM	21,09 \pm 0,5

3.2.4 Actividad guaiacol peroxidasa

Las enzimas peroxidasas catalizan una reacción redox bisustrato, ya que usan el peróxido de hidrógeno como oxidante y un segundo sustrato con características reductoras que es oxidado por el peróxido. Estas enzimas también intervienen en el desarrollo del pelo radical ya que, además de contribuir al control redox celular, regulan el entrecruzamiento y la rotura de los polisacáridos de la pared celular (Vijayakumar et al., 2016). Para profundizar sobre la relación entre el cianuro y la producción de ROS, se determinaron los niveles de actividad guaiacol peroxidasa (GPX) en los mutantes de desarrollo de pelo radical. La actividad GPX mide la actividad de todas las peroxidasas de la planta en general, ya que el guaiacol es un donador de electrones común a todas ellas (Vianello et al., 1997).

Como se puede observar en la figura 35, no se observan cambios estadísticamente significativos en los niveles de actividad GPX medidos en el mutante *cas-cl* con respecto al silvestre, ni tampoco en ninguno de los mutantes dobles con respecto a su mutante simple parental correspondiente, lo que sugiere que la actividad GPX no está afectada por la acumulación de cianuro.

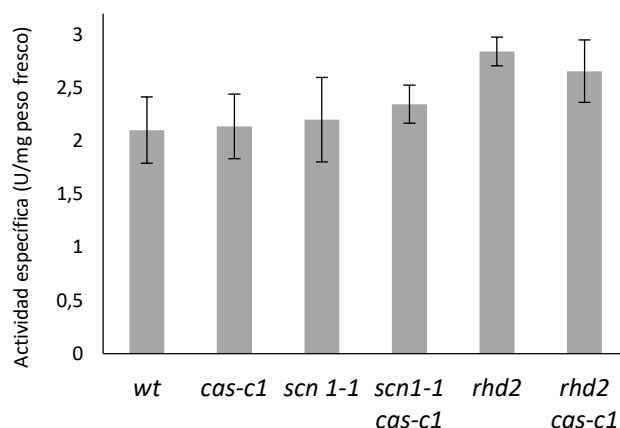


Figura 35. Determinación de la actividad GPX en raíces de *A. thaliana*. Se determinó la actividad GPX en extractos proteicos totales obtenidos a partir de raíces de plantas silvestres y mutantes de desarrollo de pelo radical cultivadas durante 14 días en placas verticales de medio MSS. Los valores son medias \pm SD de tres ensayos independientes.

3.3 Modificación post-traducciona: la S-Cianilación

El anión CN^- puede reaccionar químicamente con disulfuros alifáticos como la cistina o con péptidos que contienen enlaces disulfuros mediante ataque nucleofílico a dichos puentes disulfuros, formando el correspondiente tiocianato. En el caso de los residuos de cisteína presentes en las proteínas, se produce una cisteína cianilada (R-SCN) (Gawron and Fernando, 1961; Wagner and Davis, 1966). Esta modificación post-traducciona se ha denominado S-cianilación.

Mediante el análisis químico de formación de 2-iminotiazolidina, basado en la sensibilidad del enlace peptídico adyacente a una cisteína S-cianilada al corte por NH_4OH (Catsimpoolas and Wood, 1966; García et al., 2019), nuestro grupo identificó en hojas de plantas silvestres tratadas y sin tratar con ACC al menos 88 proteínas diferentes que presentaban esta modificación, como la ciclofilina cloroplástica CYP-20 o la enolasa ENO2. La S-cianilación de estas enzimas tiene efecto contrario, inhibiendo e induciendo su actividad, respectivamente (García et al., 2019).

Para profundizar en el mecanismo de acción del cianuro, se abordó una aproximación proteómica mediante espectrometría de masas de alta resolución con objeto de identificar posible proteínas dianas de esta modificación e identificar aquellos procesos celulares alterados y que expliquen los fenotipos observados en el mutantes *cas-c1*. De este modo, se identificaron 62 proteínas S-cianiladas (García et al., 2019).

Con objeto de reducir la complejidad del sistema en estudio, se analizaron dos subproteomas de la planta. Por un lado, y dado que la enzima CAS-C1 se localiza en la mitocondria y por lo tanto este podría ser el orgánulo donde el cianuro ejerciera su acción, se obtuvieron muestras proteicas de extractos enriquecidos en mitocondrias de raíces de plantas silvestres y mutantes *cas-c1*. Por otro lado, y dado que la mutación *cas-c1* produce una alteración en el desarrollo del pelo radical, se analizó el proteoma de células aisladas de pelos radicales tanto en plantas silvestres como en mutantes *cas-c1*. En ambos casos, se estudiaron tanto las alteraciones en el proteoma como la presencia de proteínas modificadas post-traduccionamente mediante S-cianilación.

3.3.1 Análisis proteómico mitocondrial

Para caracterizar los cambios que induce la mutación *cas-c1* en el proteoma, se analizó la composición y abundancia relativa de las proteínas de muestras enriquecidas en mitocondrias mediante la tecnología, libre de marcaje, SWATH-MS. Se obtuvo la fracción mitocondrial de muestras de raíces de plantas silvestres y mutantes *cas-c1* cultivadas durante 90 días en cultivos hidropónicos tratadas durante 24 h con ACC para inducir la generación de cianuro. Se extrajeron las proteínas de las fracciones mitocondriales y se sometieron a una digestión trípica para posteriormente analizarlas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa de alta resolución LC-MS/MS. Se analizaron tres réplicas biológicas de cada una de las líneas vegetales.

Tras la digestión, se analizaron los péptidos mediante una aproximación DDA (*Data Dependent Acquisition*) para generar una librería de espectros de fragmentación de las muestras a analizar. Se identificaron 11222 péptidos (1% FDR y 96% confianza) correspondientes a 1734 proteínas (1% FDR) (Tabla S1). Un análisis de enriquecimiento de las proteínas identificadas mediante DDA, mostró una alta representación de proteínas mitocondriales (Tabla S2).

Para la cuantificación por SWATH, las muestras se analizaron por duplicado (dos réplicas técnicas de cada una de las tres réplicas biológicas) mediante un método DIA (*Data Independent Acquisition*), usando las mismas condiciones cromatográficas utilizadas para generar la librería. Se cuantificaron 2901 péptidos y 1132 proteínas (Tabla S3). De estas, 551 fueron estadísticamente diferentes con un valor de $p < 0,05$. De este grupo, 97 proteínas eran más abundantes en las muestras silvestres (*fold change* > 1,5) y 71 más abundantes en *cas-c1*

(*fold change* < 0,66). Además, se detectaron 354 proteínas que solo estaban presentes en muestras silvestres (Tabla S4) y 282 solo presentes en *cas-c1* (Tabla S5).

Se analizaron y clasificaron funcionalmente las 354 y 97 proteínas ausentes y menos abundantes en *cas-c1*, respectivamente, usando la nomenclatura del programa MapMan desarrollada por (Klie and Nikoloski, 2012). Esta nomenclatura cataloga las proteínas en 28 grupos funcionales diferentes (Tabla S6). En este análisis, el grupo más numeroso de proteínas (17,1% del total) correspondía a la categoría de “proteínas generales” (bin 29) que incluye síntesis y degradación de proteínas, dianas subcelulares y modificaciones post-traduccionales. Muchas de las proteínas identificadas están relacionadas con la respuesta inmune y el estrés biótico (Fig. 36A). Por otra parte, la clasificación según su ontología génica (GO) muestra un grupo muy importante de proteínas (13,3%) relacionadas con señalización, de las cuales 26 están involucradas en la respuesta a patógenos: proteínas quinasas ricas en leucina, proteínas receptoras "Domain of unknown function 26" (DUF26) y lectina quinasas (Fig. 36B; Tabla S6).

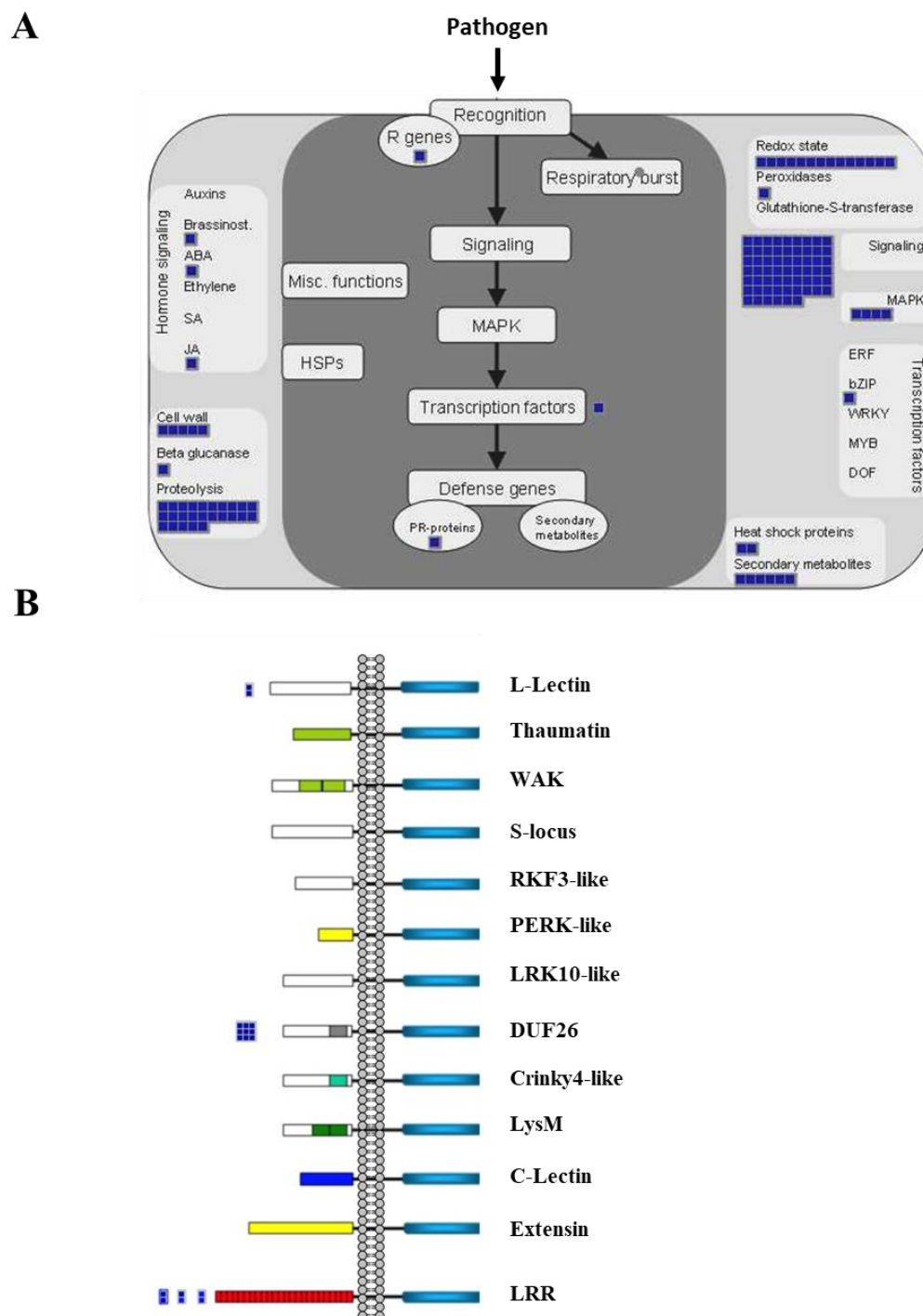


Figura 36. Ruta de señalización y componentes involucrados en el estrés biótico de las proteínas ausentes y menos abundantes en *cas-cl*. A) Los rectángulos azules representan las proteínas clasificadas en el grupo “estrés biótico” en el GO de Mapman. B) Los rectángulos azules representan las proteínas clasificadas en el grupo “receptores quinases unidos a membrana” de la categoría funcional de proteínas con función señalizadora en el GO de Mapman

Igualmente, se clasificó mediante el programa MapMan el grupo de proteínas presentes (282 proteínas) y más abundantes (71 proteínas) en las muestras procedentes del mutante *cas-cl* que

en las muestras procedentes de plantas silvestres, formado por un total de 353 proteínas (Tabla S7). De nuevo la categoría más representada fue “proteínas generales”. Al usar la herramienta PANTHER DB (Mi et al., 2017) se detectó un enriquecimiento de 9,52 veces en proteínas involucradas en la regulación del metabolismo de los carbohidratos (NF-YC1, NF-YC3, NF-YC4 y NF-YC9), de 9,33 veces en proteínas del catabolismo de los aminoácidos y de 7,35 veces en proteínas de fagocitosis y tráfico de membranas (Tabla suplementaria S8).

Para determinar la relevancia funcional de la mutación *cas-cl* en la fisiología y desarrollo de la planta, se analizaron las posibles interacciones proteína-proteína en el conjunto de 353 proteínas más abundantes en el mutante *cas-cl* con respecto al silvestre, mediante la base de datos STRING v10.5 (Szklarczyk et al., 2015) (Fig. 37). Se observaron 295 interacciones que se detallan en la figura 37. Se detectaron 4 nodos claramente diferenciados y conectados biológicamente entre ellos:

- Nodo1 (amarillo): ribonucleoproteínas.
- Nodo 2 (rojo): proteínas del complejo del espliceosoma conectadas mediante la ubiquitin-ligasa E3 MAC3B a otro grupo de quinasas dependientes de ciclina (CDKC1, CDKC2, CDKD1, CDKD3) y proteasas específicas de ubiquitina (UBP12 y UBP13).
- Nodo 3 (azul): biosíntesis de lignina (ELI3-2, CYP84A1 y IRX4) y peroxidasas (PER7, PER16, PER23, PER27, PER32, PER44, PER45 y PER49).
- Nodo 4 (verde): proteínas del sistema de endomembranas, proteínas reguladoras del tráfico de membrana, RAB GTPasas y los factores de transcripción NF-YC1, NF-YC3, NF-YC4 y NF-YC9, que regulan la expresión de determinados genes por acetilación y metilación de histonas.

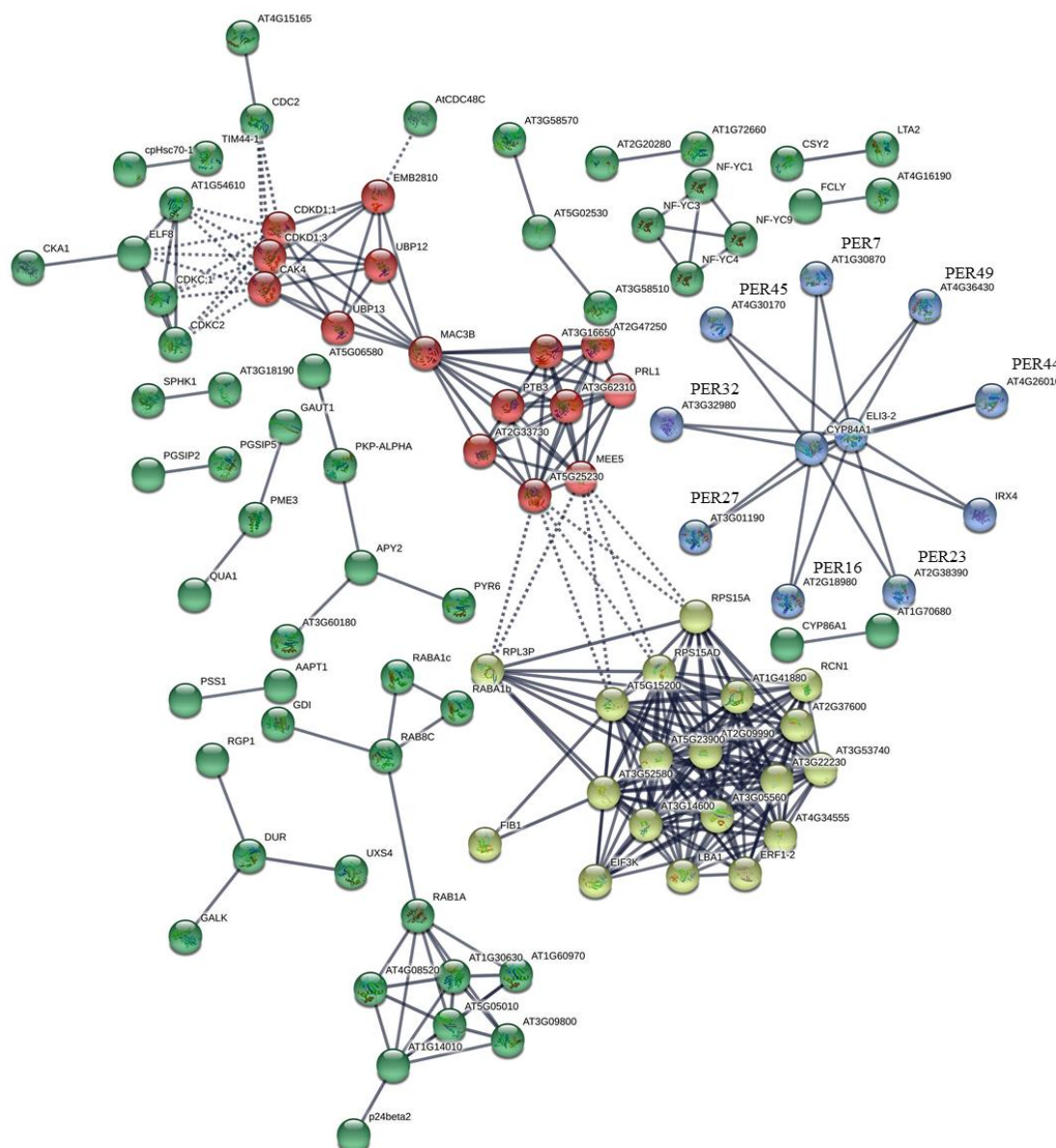


Figura 37. Red de interacciones en las proteínas más abundantes en *cas-cl*. Las proteínas están representadas por círculos y las interacciones por líneas. Las líneas discontinuas representan interacciones entre componentes de diferentes nodos.

Por otra parte, se estudió la presencia de *S*-cianilación en las muestras enriquecidas en proteínas mitocondriales buscando péptidos que presentaran un incremento de masa de 25,0095 Da en los espectros de fragmentación, correspondiente al peso molecular del residuo -CN. En total, se identificaron 13 péptidos que correspondían a 11 proteínas *S*-cianiladas. De las 11 proteínas *S*-cianiladas, 7 estaban presentes en ambos fondos genéticos. Además, se detectaron 2 proteínas *S*-cianiladas en las muestras silvestres que no se detectaron en *cas-cl* y otras 2 proteínas *S*-cianiladas presentes en *cas-cl* no identificadas en las muestras silvestres (Fig. 38).

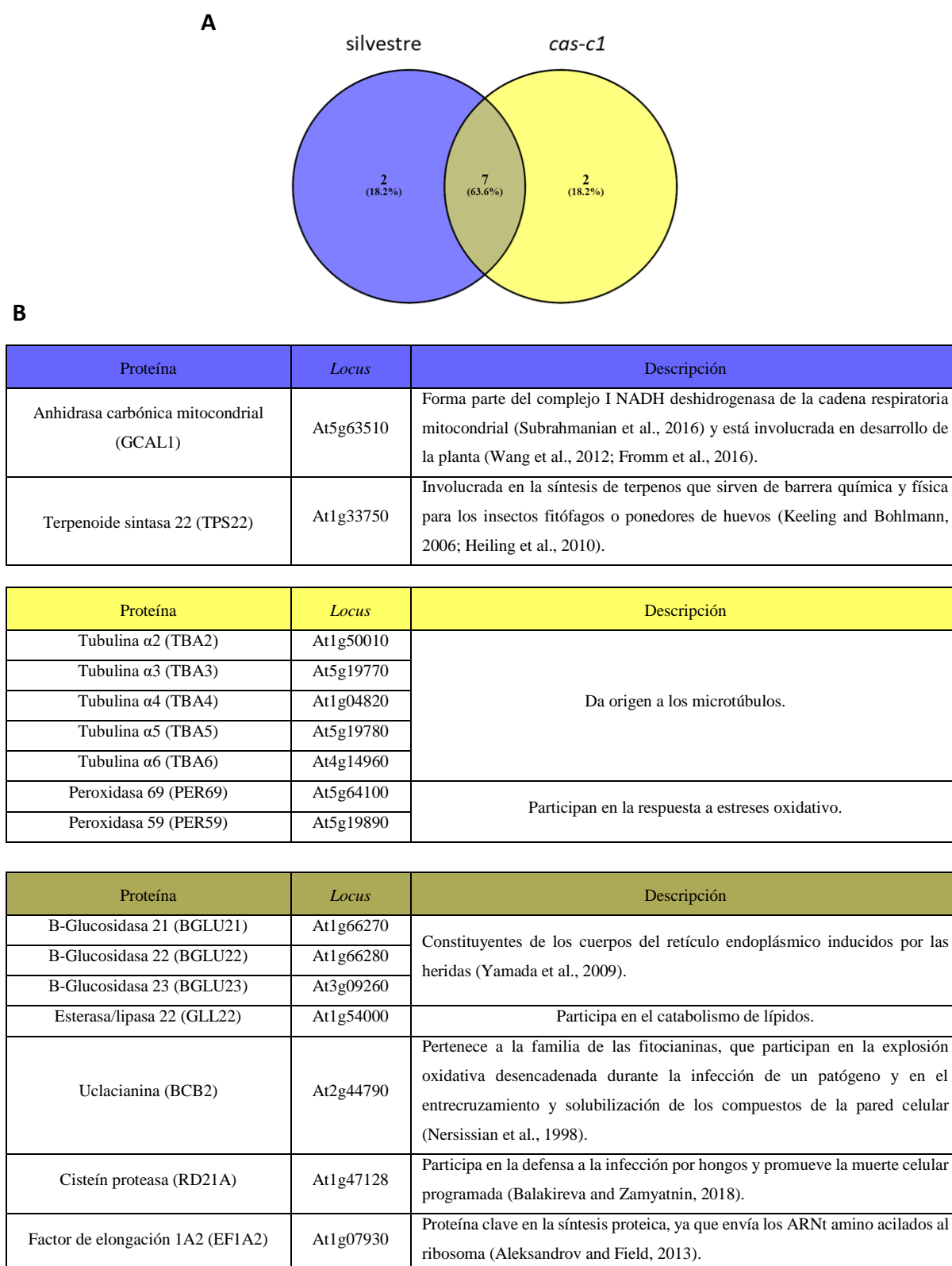


Figura 38. Proteínas S-cianiladas en muestras enriquecidas en mitocondrias. (A) Diagrama de Venn de las proteínas S-cianiladas en las muestras enriquecidas en mitocondrias. El círculo color azul representa las proteínas S-cianiladas identificadas en al menos una de las tres réplicas biológicas de las muestras silvestres analizadas y el círculo amarillo las de las muestras *cas-c1* (B) Lista de las proteínas S-cianiladas en las muestras enriquecidas en mitocondrias.

Entre las 7 proteínas *S*-cianiladas identificadas en ambos fondos genéticos encontramos tres β -glucosidasas (BGLU21, BGLU22 y BGLU23), la proteína involucrada en el catabolismo de lípidos GLL22, la cisteín-proteasa RD21A, el factor de elongación EF1A2, y la uclacianina BCB2. Las dos proteínas presentes exclusivamente en las muestras silvestres son la anhidrasa carbónica γ mitocondrial (GCAL1) y la terpenoide sintasa 22 (TPS22). En este grupo podemos incluir a BCB2, ya que se encuentra cianilada en las tres muestras silvestres y solo en una de las mutantes *cas-c1*. Las proteínas tubulina α 2-6 (TBA2-6) y peroxidasa 59 y 69 (PER59 y PER69) se encuentran *S*-cianiladas únicamente en las muestras *cas-c1*. La cisteín-proteasa RD21A, involucrada en la defensa a la infección por hongos, se encuentra *S*-cianilada en todas las muestras *cas-c1* pero solo en una muestra silvestre. La *S*-cianilación de esta proteína podría estar afectando negativamente a su actividad, lo que explicaría la mayor sensibilidad del mutante *cas-c1* al hongo *Botrytis cinerea* descrita (Garcia et al., 2013).

3.3.2 Análisis proteómico del pelo radical

Para realizar el análisis proteómico de pelos radicales se aislaron protoplastos de raíces de plantas silvestres y mutantes *cas-c1* que expresaban la proteína GFP bajo el control del promotor COBL9 (COBRA-like protein 9) (Fig. 39), que dirige la expresión de manera específica a células de pelos radicales (Brady et al., 2007).

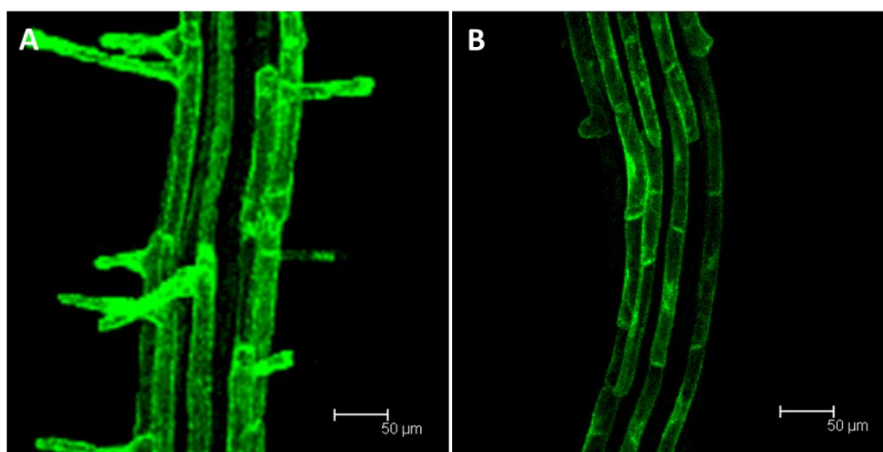


Figura 39. Expresión de la GFP bajo el promotor COBL9 en plantas silvestres transformadas con la construcción *pCOBL9:GFP* (A) y plantas mutantes *cas-c1* cruzadas con las plantas silvestres transformadas con *pCOBL9:GFP* (B), ambas cultivadas durante 6 días en medio MSS. Escala = 50 μ m

Mediante citometría de flujo de células activadas por fluorescencia (FACS) se aislaron 1×10^6 protoplastos de tres réplicas independientes de raíces de plantas silvestres y mutantes *cas-cl* expresando la construcción *pCOBL9:GFP*. Las proteínas extraídas de cada muestra se digirieron con tripsina y los péptidos resultantes se analizaron por LC-MS/MS para la identificación de proteínas y de péptidos S-cianilados.

En las muestras silvestres se han identificado ($FDR < 1\%$) 3829 proteínas, lo que representa más del 10% del proteoma total de *Arabidopsis*. En ensayos previos en los que se analizó el proteoma de la raíz completa mediante una aproximación experimental similar, se identificaron 1387 proteínas en el pelo radical (Petricka et al., 2012), de las cuales el 90% han sido también identificadas en este trabajo.

La clasificación GO de procesos biológicos de las proteínas identificadas en las muestras de plantas silvestres muestra que la mayoría de estas proteínas están involucradas en procesos celulares y metabólicos, pero encontramos un importante subgrupo de proteínas implicadas en la respuesta a estímulos (Fig. 40). El análisis de enriquecimiento GO de estas muestras silvestres muestra, además, una sobrerrepresentación de procesos metabólicos UMP (uridina monofosfato) y GTP (guanosina trifosfato) y la biosíntesis del ribonucleósido pirimidina monofosfato y 5-fosforibosa 1-difosfato (Tabla S9).

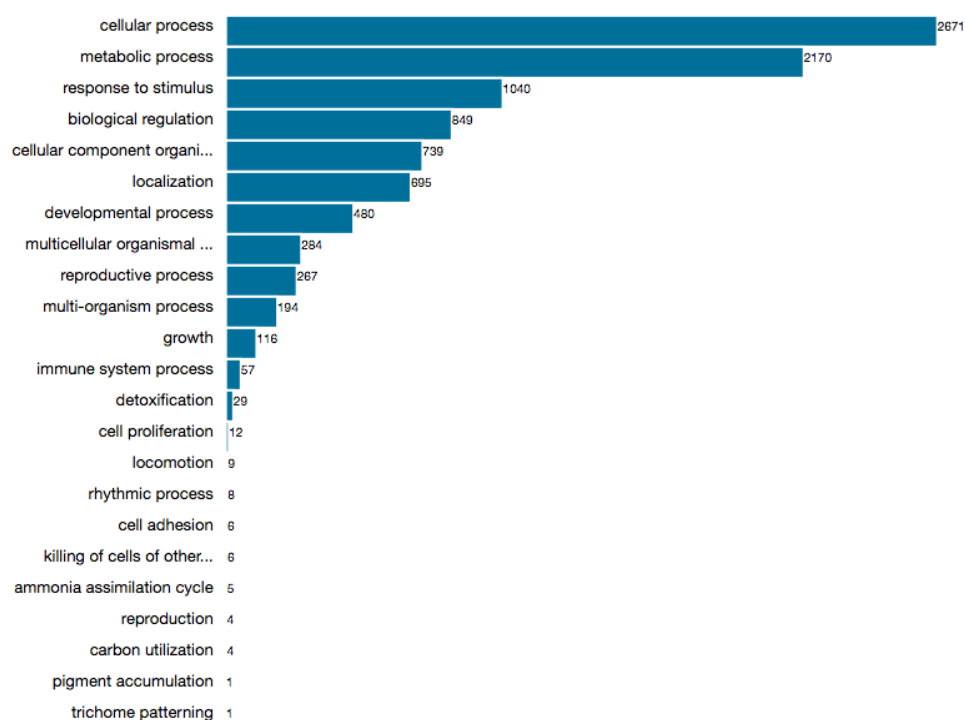


Figura 40. Clasificación funcional por procesos biológicos de las proteínas identificadas en las muestras silvestres del pelo radical.

El análisis de las muestras de los pelos radicales del mutante *cas-c1* permitió identificar 3963 proteínas (Tabla S10), de las cuales 3478 eran comunes a las identificadas en los pelos radicales silvestres (Fig. 41).

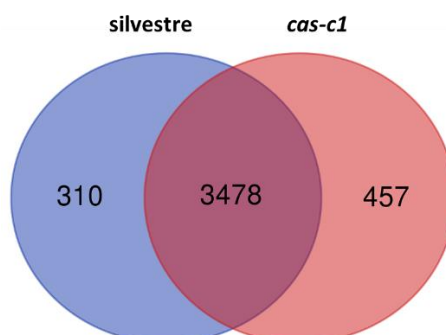


Figura 41. Diagrama de Venn comparativo de las proteínas identificadas en las muestras silvestres y mutantes *cas-c1* del pelo radical.

Por lo tanto, se identificaron 310 proteínas que solo estaban presentes en los pelos radicales de las plantas silvestres y 457 proteínas que estaban presentes solo en los pelos radicales de los mutantes *cas-c1*, lo que indica que la supresión de la actividad CAS-C1 provoca importantes cambios en el proteoma del pelo radical. El análisis de enriquecimiento de GO de estas 457 proteínas presentes solo en las muestras *cas-c1* muestra un enriquecimiento en proteínas involucradas en el transporte de RNA al núcleo y la biosíntesis de desoxirribonucleótidos, *splicing* de mRNA y procesamiento (Tabla S11). La búsqueda de estas proteínas en las bases de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) muestra que en las muestras *cas-c1* se encuentra sobre-representada la ruta del espliceosoma con 22 proteínas, la ruta de transporte de RNA con 12 proteínas y la de supervisión del mRNA, con 9 proteínas (Fig. 42A). Este grupo de 22 proteínas del espliceosoma incluye componentes del complejo de las ribonucleoproteínas nucleares U1, U2, U4, U5, U6, como SPF3 y YLS8; el complejo Prp19 y las helicasas de RNA Prp2 y Prp22 (Fig. 42B).

A

Espliceosoma	Transporte de ARN	Supervivencia del ARNm
AT1G09140	AT1G15200	AT1G15200
AT1G27650	AT1G24310	AT1G27595
AT1G27900	AT1G33410	AT3G26618
AT1G32490	AT1G64350	AT4G11240
AT1G44910	AT1G77840	AT4G36960
AT2G02570	AT2G41620	AT5G14530
AT2G18510	AT3G14120	AT5G27840
AT2G23930	AT4G21900	AT5G37720
AT2G33730	AT4G32910	AT5G51660
AT2G41500	AT5G37720	
AT2G43770	AT5G38640	
AT3G02710	AT5G56130	
AT3G05070		
AT3G12580		
AT3G56860		
AT4G15900		
AT4G22350		
AT4G30220		
AT5G08290		
AT5G12190		
AT5G37720		
AT5G56130		

B

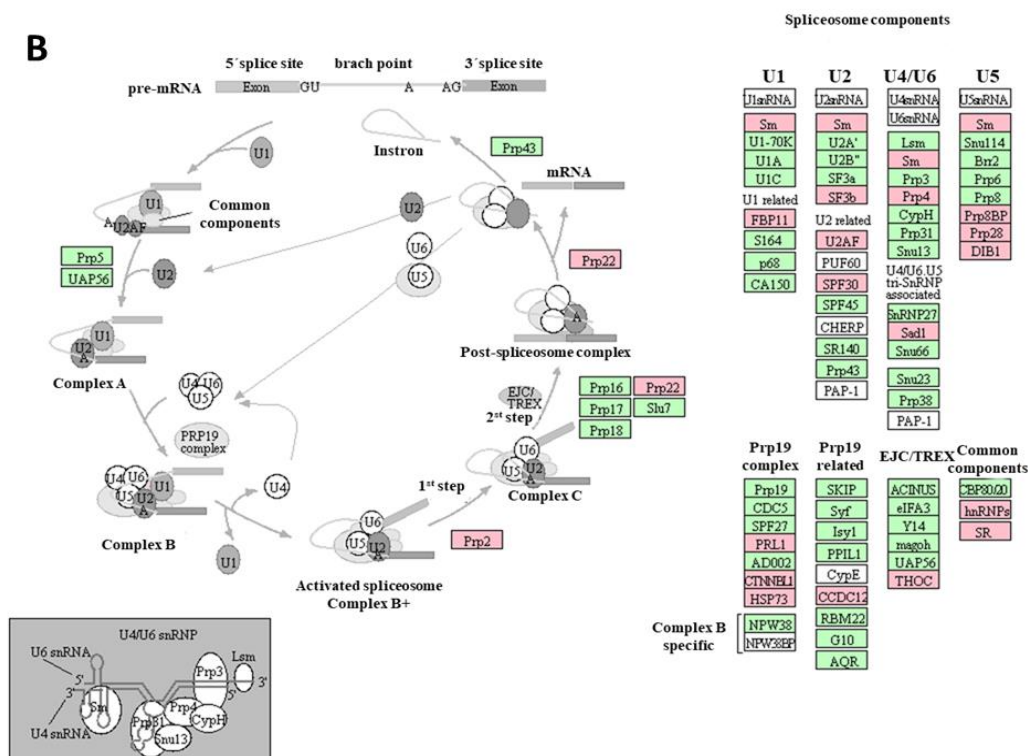


Figura 42. Proteínas sobre-representadas en las muestras mutantes *cas-cl* de pelos radicales usando la base de datos KEGG. A) Listado de proteínas sobre-representadas en las rutas del spliceosoma, del transporte de RNA y de supervisión del mRNA. B) Representación gráfica de la ruta del spliceosoma extraída de la base de datos KEGG así como las proteínas involucradas en esta ruta. Las proteínas identificadas solo en *cas-cl* se muestran en color rosa.

En este grupo de 457 proteínas identificadas solo en los pelos radicales *cas-c1* se analizaron, además, la red de interacciones proteína-proteína mediante la base de datos STRING v10.5, observándose 611 interacciones, usando la máxima confianza (interaction score > 0,900). El análisis destaca al menos tres grupos (o clusters) de proteínas biológicamente interconectadas. Uno de los grupos con 27 proteínas incluye 22 de las proteínas que participan en la ruta del espliceosoma (Fig. 43, nodos verdes) descritas anteriormente. Este grupo está conectado a un segundo subgrupo a través de la subunidad alfa de la RNA polimerasa NRPB11 que contiene 28 proteínas implicadas en la biogénesis de los ribosomas, y el procesamiento al núcleo de los rRNA, tales como la 3-5'-exonucleasas CER7 y RRP41L (Fig. 43, nodos turquesas). Finalmente, un tercer grupo incluye proteínas implicadas en varios procesos metabólicos tales como la glicolisis, así como 6 proteínas componentes del complejo THO implicadas en transporte de proteínas al nucleo, como ALY4 y TEX1 (Fig. 43, nodos rojo).

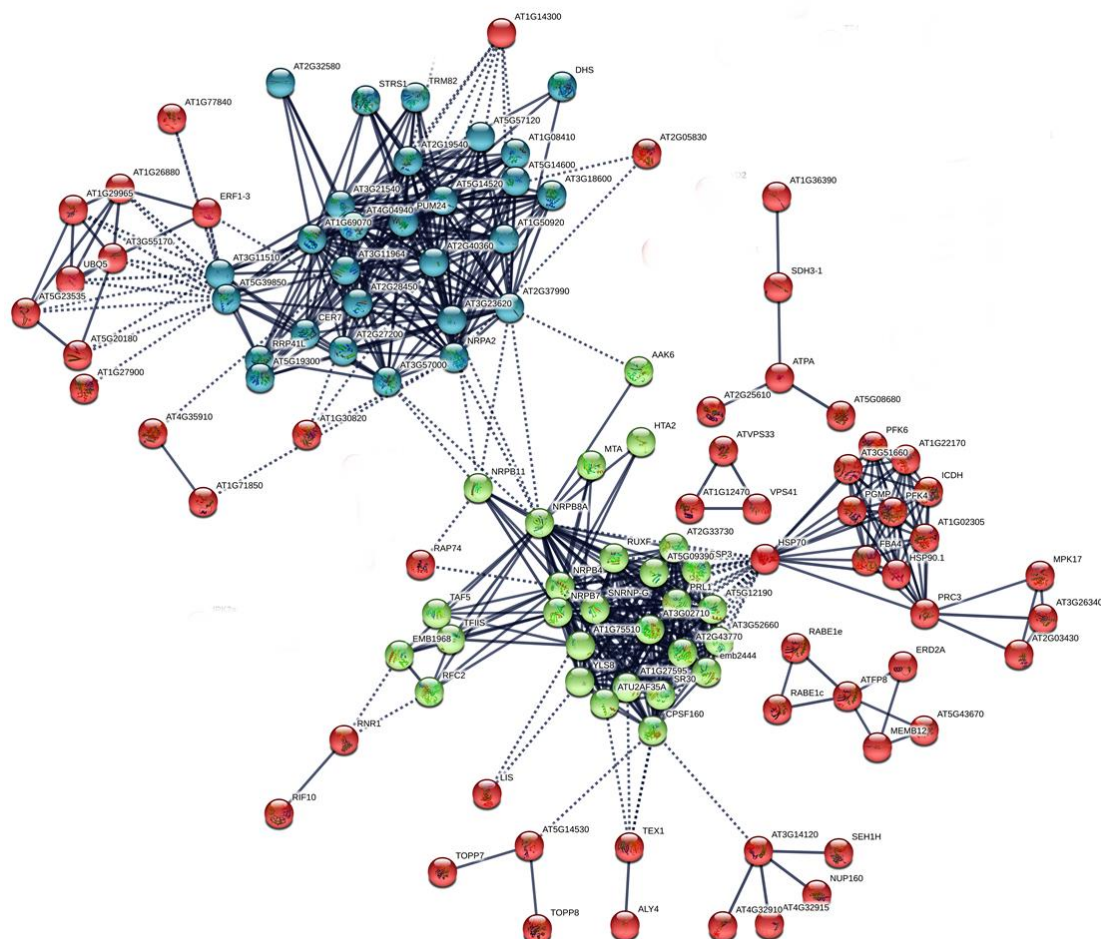
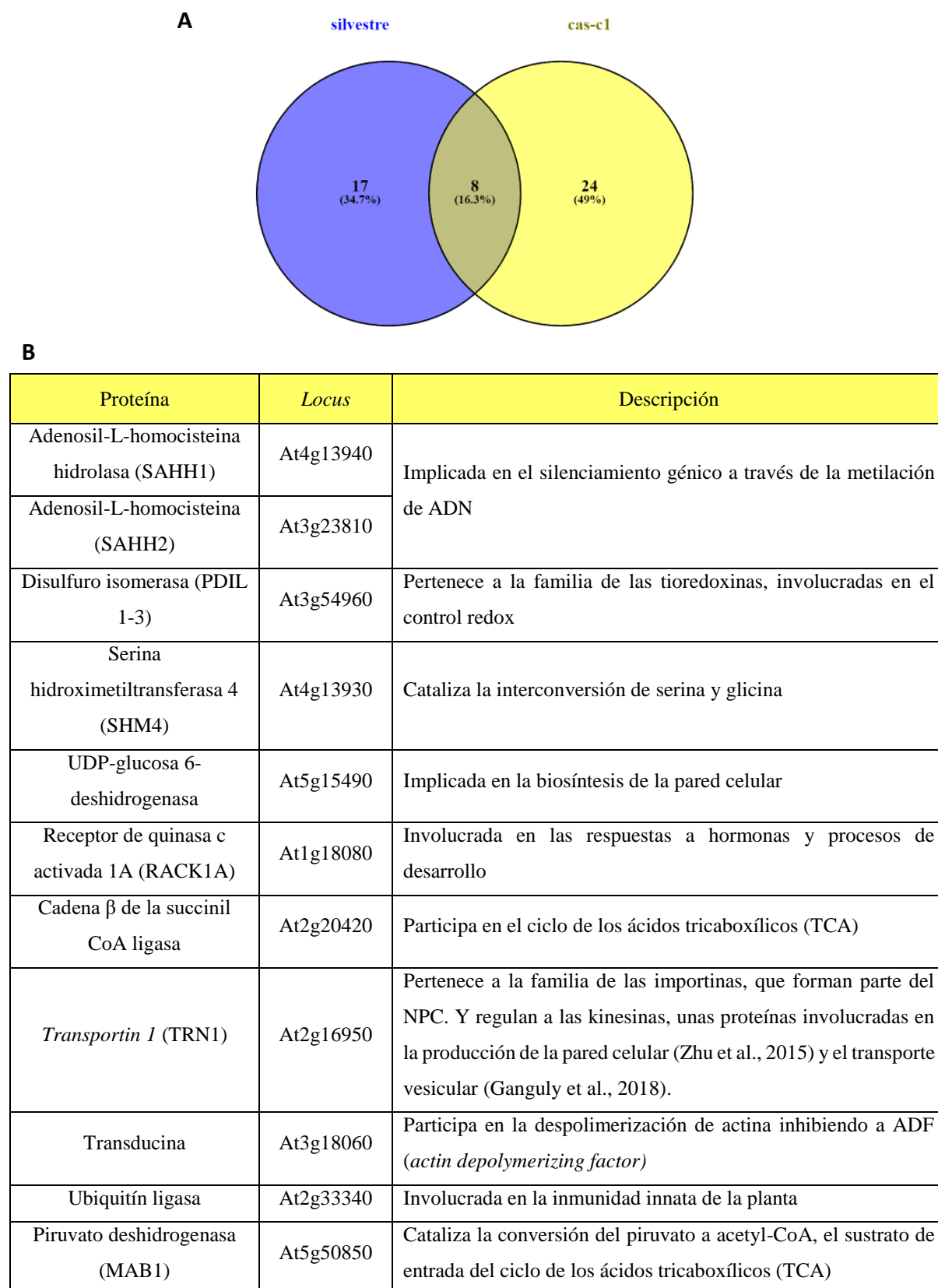


Figura 43. Interacciones de las proteínas presentes únicamente en los pelos radicales del mutante *cas-c1*. Los círculos representan proteínas y las líneas interacciones. Las líneas discontinuas representan interacciones entre componentes de diferentes nodos.

La búsqueda de péptidos *S*-cianilados identificó 25 proteínas *S*-cianiladas en los pelos radicales de las raíces de plantas silvestres y 32 en el mutante *cas-c1* (Tabla S12, Fig. 44).



Tioredoxina 3 (TRX 3)	At5g42980	Pertenece a la familia de las tioredoxinas, involucradas en el control redox
UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa	At1g31070	Participa en la biosíntesis de la pared celular
Familia proteica de la epimerasa diamonipimelato	At3g53580	Participa en la biosíntesis de L-lisina
Amino oxidasa de cobre	At2g42490	Amino oxidase de cobre localizada en el peroxisoma e involucrada en la formación de raíces laterales
ATPasas	At3g28715	Responsables de la acidificación de varios compartimentos intracelulares y participan además en la producción de energía
ATPasas	At3g28710	
Inositol 1,3,4-trisfosfato 5/6-quinasa	At5g16760	Segundo mensajero de la transducción de la señal celular, que participa en la movilización del Ca^{2+} (Tsui and York, 2010).
Factor de inicio de la traducción (EIF5A-3)	At1g69410	Participa en la traducción proteica
Factor de inicio de la traducción (EIF5A-1)	At1g13950	
<i>Ubiquitin fusion degradation</i> (UFD1)	At2g21270	Implicada en procesos catabólicos dependientes de ubiquitina
RNA-editing factor interacting protein 1 (RIP1)	At3g15000	Participa en la edición de RNA del cloroplasto y la mitocondria
Glutación transferasa (GST12)	At1g27130	Involucrada en la respuesta a patógenos
Tioredoxin reductasa dependiente de NADPH (NTR1)	At4g35460	Pertenece a la familia de las tioredoxinas, involucradas en el control redox

Figura 44. Proteínas S-cianiladas en muestras de pelos radicales. (A) Diagrama de Venn de las proteínas S-cianiladas en las muestras de pelos radicales. El círculo color azul representa las proteínas S-cianiladas identificadas en al menos una de las tres réplicas biológicas de las muestras silvestres analizadas y el círculo amarillo las de las muestras *cas-cl* (B) Lista detallada de las proteínas S-cianiladas en las muestras de pelos radicales del mutante *cas-cl*.

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis doctoral aportan nueva información sobre la función reguladora del cianuro en dos procesos fundamentales de la planta *A. thaliana*, como son el desarrollo del pelo radical y la respuesta a patógenos. Además, ponen de manifiesto un nuevo modo de acción del cianuro a través de una nueva modificación post-traducciona de proteínas: la S-cianilación.

1. Función reguladora del cianuro en el proceso de formación del pelo radical

La localización mitocondria de la proteína CAS-C1 de Arabidopsis fue descrita por Yamaguchi y sus colaboradores, utilizando una construcción que constaba del promotor constitutivo CaMV35S fusionado a la secuencia N-terminal de la proteína CAS-C1 y a la proteína GFP. En esta tesis doctoral se ha simulado al máximo las condiciones *in vivo* de la planta, incluyendo en la construcción el promotor de *CAS-C1* y la secuencia codificadora completa de la proteína CAS-C1. Así pues, la construcción *ProC1:CASC1-GFP* utilizada nos permitió confirmar la localización mitocondria de la proteína CAS-C1 previamente descrita (Yamaguchi et al., 2000), así como obtener información adicional sobre su regulación. Para confirmar que la proteína de fusión se localizaba en la mitocondria, se realizaron tinciones con el fluoróforo marcador de mitocondria Mitotracker Deep Red 633, y se constató que la señal de GFP coincidía con la señal de dicho marcador. Además, observamos una acumulación de la proteína marcada en las mitocondrias de la punta del pelo radical durante su proceso de formación. En la punta del pelo radical en crecimiento, las vesículas producidas por el RE y el complejo de Golgi liberan mediante exocitosis polisacáridos y glicoproteínas de la pared celular, así como proteínas sintasas de componentes de la pared celular y transportadores de membrana (Ketelaar et al., 2008). Este tráfico vesicular requiere altos niveles de energía. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, junto con otros previos publicados por nuestro grupo (García et al., 2010), sugieren que la mitocondria, además de proporcionar la energía y ser reservorio de Ca^{2+} necesario para la elongación, modula a través de la actividad CAS-C1 los niveles de cianuro adecuados para la correcta elongación del pelo radical. A diferencia de las plantas silvestres, los mutantes de pelos radicales *cas-c1*, *scn1-1* y *rh2* transformados con la construcción *ProC1:CASC1-GFP* no presentaron acumulación de mitocondrias en la punta del pelo radical.

Existen relaciones de epistasia entre los genes involucrados en la formación del pelo radical y *CAS-C1*, tal como muestran los análisis de transcripción, los cruces genéticos y los ensayos de

crecimiento con hidroxocobalamina. La expresión de *CAS-C1* en el fondo *scn1-1* se reduce notoriamente mientras que aumenta en *rhb2*. Además, mientras que el fenotipo del cruce genético *scn1-1 cas-c1* es idéntico al del mutante simple *scn1-1*, el del cruce *rhb2 cas-c1* es equivalente al del mutante *cas-c1*. Estos resultados demuestran que la mutación *cas-c1* es epistática sobre la mutación *rhb2* e hipostática sobre *scn1-1*. Estas relaciones de epistasia se confirmaron, además, cuando se realizaron ensayos de crecimiento con el antídoto del cianuro hidroxocobalamina. La hidroxocobalamina es capaz de revertir el fenotipo de los mutantes *cas-c1* y *rhb2 cas-c1*, pero no el del mutante doble *scn1-1 cas-c1*. Esto sugiere que el efecto represor del cianuro es ineficaz en el fondo mutante *scn1-1*. Sin embargo, en el fondo mutante *rhb2*, el cianuro ejerce una función represora, aunque los ensayos realizados en este trabajo descartan que la NADPH oxidasa RHD2 sea su diana directa. De igual forma, en las etapas iniciales de la formación del pelo radical es necesaria la acción conjunta de una serie de factores de transcripción como RHD6, una proteína clave en el inicio del crecimiento del pelo radical así como en la determinación de la posición donde este va a desarrollarse (Grierson et al., 2014), o RSL4, una proteína regulada por RHD6 que regula el crecimiento polar de las células (Vijayakumar et al., 2016; Marzol et al., 2017). Posteriormente, en la etapa de elongación del pelo radical participan multitud de proteínas implicadas en la biosíntesis de la pared celular como MRH5 y FLA6. Al analizar la expresión de los genes *MHR5*, *FLA6*, *RHD6* y *RSL4* en raíces de plantas silvestres y mutantes simples y dobles de pelo radical, se comprobó que todos ellos estaban reprimidos en el mutante *cas-c1*, por lo que suponemos que la acción del cianuro en el desarrollo del pelo radical debe tener lugar en etapas tempranas de este proceso.

Puesto que proponemos que la acumulación de cianuro en las mitocondrias de la punta del pelo radical produce defectos en el desarrollo del pelo radical, se analizaron los niveles de cianuro en las plantas mutantes simples y dobles. Todas las líneas que presentaban la mutación *cas-c1* mostraron menor actividad CAS-C1 y, como consecuencia, mayor acumulación de cianuro que sus parentales. El mutante doble *scn1-1 cas-c1* presenta una mayor acumulación de cianuro que su parental *scn1-1*, a pesar de presentar fenotipos similares, demostrando que *SCN1* es epistático sobre *CAS-C1* y que la acumulación de cianuro no es la responsable del fenotipo del mutante *scn1-1*.

Otro factor de suma importancia en la regulación de la formación del pelo radical es el etileno. El etileno induce la elongación del pelo radical mediante el control de los niveles de auxinas y a través de EIN3, que se une físicamente a RHD6 y este activa a RSL4 (Feng et al., 2017). Dado que el cianuro se co-produce con el etileno (Wang et al., 2002), su acumulación en el

mutante *cas-c1* podría inducir la represión de la síntesis de etileno, para así reducir los niveles de cianuro, creando un ciclo de retroalimentación negativa, que explicaría el fenotipo de ausencia de pelos radicales del mutante *cas-c1*. Sin embargo, a pesar de que los niveles de etileno en las plantas portadoras de la mutación *cas-c1* se reducen notoriamente, el aporte exógeno de ACC en el medio de crecimiento no consigue revertir el fenotipo de pérdida de pelos radicales en los mutantes *cas-c1*, y *rh2 cas-c1*, demostrando así que la reducción en los niveles de etileno asociada a la mutación *cas-c1* no es la responsable del fenotipo de falta de pelos radicales.

A continuación se muestra un modelo que detalla la posible participación del cianuro en el proceso de desarrollo del pelo radical (Fig. 45)

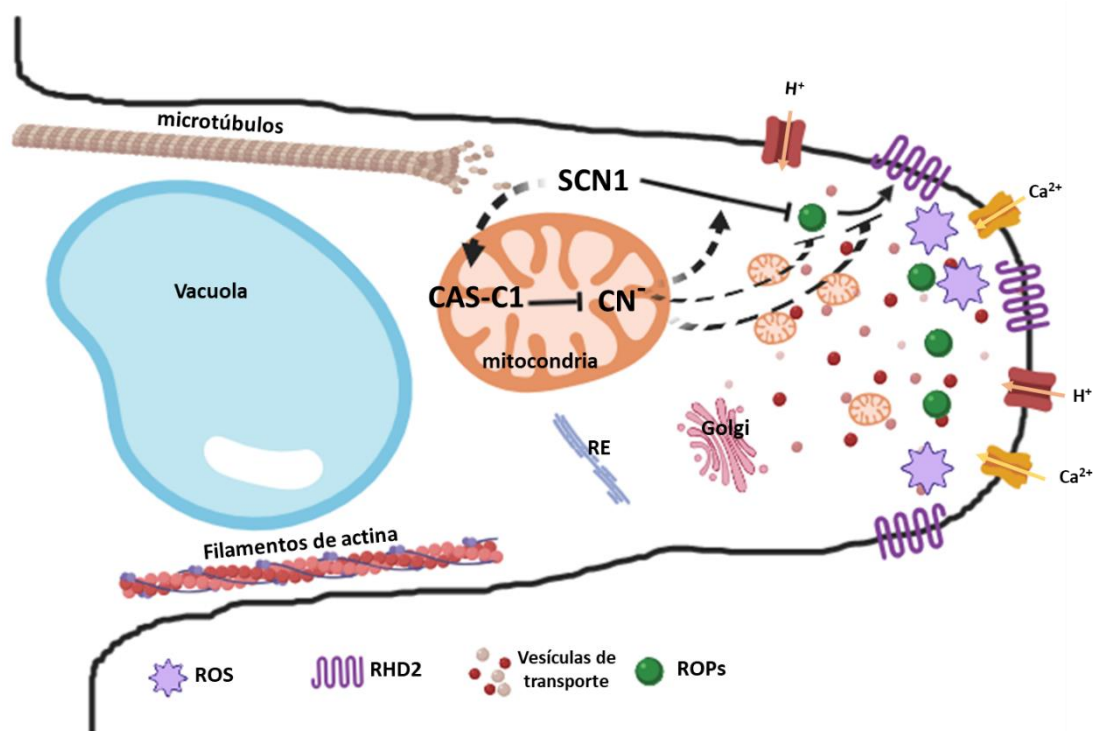


Figura 45. Función reguladora del cianuro en el proceso de formación del pelo radical. La formación del pelo radical se inicia con una protuberancia en cuya base se concentra retículo endoplásmico, actina filamentososa y las proteínas ROPs. SCN1 inhibe las ROPs, que son esenciales para la producción apical de ROS por parte de la NADPH oxidasa RHD2, que activan a su vez los canales de entrada de Ca²⁺. Además, se produce una bajada de pH que activa las expansinas y permite la relajación de la pared celular y la posterior elongación. El cianuro, cuya concentración es controlada por la enzima mitocondrial CAS-C1, actuaría entre la acción de SCN1 y la producción de ROS de RHD2, bien favoreciendo la inhibición de las ROPs por parte de SCN1 o inhibiendo la acumulación de ROPs o el posicionamiento apical de RHD2. Las líneas continuas señalan relaciones ya establecidas y las líneas discontinuas las relaciones propuestas.

2. Función reguladora del cianuro en el proceso de respuesta a la infección por patógenos

La acumulación de cianuro y del transcrito *CAS-CI* durante interacciones compatibles e incompatibles con cepas virulentas y avirulentas de *P. syringae* mostró que, mientras que en infecciones con *Pst* DC3000 se produjo un aumento transcripcional del gen *CAS-CI* y una disminución de los niveles de cianuro, en las infecciones con la cepa avirulenta *Pst* DC3000 *avrRpm1*, capaz de desencadenar la ETI y, como consecuencia una HR que induce una PCD, se produjo una represión transcripcional de *CAS-CI* y un aumento de los niveles de cianuro (Garcia et al., 2013). Durante esta tesis doctoral se ha profundizado en la regulación de *CAS-CI* durante la respuesta de las plantas a bacterias compatibles e incompatibles mediante el uso de la construcción *ProCI:CASCI-GFP*, que permitió observar la acumulación y localización de la proteína CAS-C1 *in vivo* mediante la fluorescencia de la GFP fusionada. Los resultados obtenidos confirman que el cianuro regula la respuesta a patógenos específicamente durante interacciones incompatibles.

Los análisis transcriptómicos realizados previamente en nuestro grupo de investigación mostraron una clara regulación por cianuro de la ruta de respuesta a patógenos biótros mediada por SA, que coincidía con el aumento de la resistencia a patógenos biótros observada en el mutante *cas-c1*, tanto en ensayos previos (Garcia et al., 2013), como en los ensayos de resistencia a *P. syringae* realizados durante esta tesis doctoral. La producción de ROS por parte de la NADPH oxidasa ATRBOHD es necesaria para la correcta activación de la respuesta a patógenos mediada por SA (Zhang et al., 2018). Así pues, el mutante *atrbohD3* presentaba unos niveles menores de SA, así como una mayor susceptibilidad frente a la infección con *P. syringae* que las plantas silvestres. Sorprendentemente, el doble mutante *atrbohD3 cas-c1* presentaba una resistencia a la infección considerablemente mayor que el mutante simple *atrbohD3*, sugiriendo que la acumulación de cianuro debida a la mutación *cas-c1* podría ser capaz de mimetizar o reemplazar el efecto de las ROS producidas por la NADPH oxidasa en la activación de las defensas de la planta. Sin embargo, esta mayor resistencia a la infección presentada por *atrbohD3 cas-c1* confronta con los ínfimos niveles de SA detectados en este mutante. Dado que las mediciones de SA se realizaron en condiciones control sin infección, serían necesarias mediciones de SA específicamente durante la infección para esclarecer esta aparente contradicción. Además, la mayor parte del SA es transformado a la forma inactiva SAG por acción de las enzimas glucosil transferasas y almacenado posteriormente en la vacuola (Lee and Raskin, 1998; Dean et al., 2005; Fu and Dong, 2013).

Tras una infección por un patógeno, el SAG almacenado puede ser rápidamente hidrolizado a su forma activa SA y contribuir a la resistencia de la planta al patógeno (Fu and Dong, 2013). Las mediciones de la acumulación de la forma inactiva SAG podrían esclarecer si el reservorio vacuolar de SAG estaría contribuyendo al aumento de la resistencia a la infección mostrado en *atrbohD3 cas-c1*. Por el contrario, el cianuro no es capaz de mimetizar o sustituir el efecto del SA, ya que tanto la línea sobreexpresora NahG como NahG *cas-c1*, ambas con niveles reducidos de SA, mostraron mayor susceptibilidad a la infección con *P. syringae* que las plantas silvestres. Estos resultados confirman que el cianuro es capaz de mimetizar o reemplazar el efecto de las ROS producidas por la NADPH oxidasa en la activación de las defensas de la planta, pero no es capaz de mimetizar el efecto del SA, por lo que el aumento en la resistencia a patógenos biótrosos observado en el mutante *cas-c1* depende de la acumulación de SA. También se ha observado una hipersensibilidad de *cas-c1* al SA que podría estar produciendo una sobre-activación de la respuesta dependiente de SA, y una sobre-activación por tanto, de la muerte celular asociada a la ETI, razón por la cual estas plantas desarrollarían hipersensibilidad al SA. Los mutantes *cas-c1* no presentan lesiones del tipo de la HR en condiciones control (García et al., 2013), pero es posible que induzcan la HR en respuesta a una infección compatible y eso justifique su mayor resistencia a *Pseudomonas* e incluso su sensibilidad a SA.

La proteína NPR1 es un regulador clave en la ruta de respuesta a patógenos dependiente de SA (Cao et al., 1997), pues controla la expresión de más del 98% de las proteínas que participan en esta ruta (Wang et al., 2006). Cuando se produce una infección por un patógeno, el SA induce cambios en el estado redox celular que provocan la monomerización de NPR1 que entra en el núcleo e interacciona con los factores de transcripción TGA, induciendo la expresión de genes de defensa como los genes *PR* (Fu and Dong, 2013). NPR1 activa al gen *PR-1* (Kinkema et al., 2000; Johnson et al., 2003), que está inducido transcripcionalmente en las plantas mutantes *cas-c1* en estado basal, según resultados previos de nuestro grupo de investigación (García et al., 2013). La proteína NPR1 era, por tanto, una candidata a la regulación por cianuro. La aplicación exógena de SA, así como de sus análogos biológicamente activos como el ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), es ampliamente utilizada para inducir la monomerización de NPR1 en los ensayos *in vitro* (Mou et al., 2003; Tada et al., 2008; Lindermayr et al., 2010). El uso de la construcción *2x35S:NPR1-GFP* nos permitió analizar la expresión y localización subcelular de la proteína NPR1 en el mutante *cas-c1*. Tanto antes como después de los tratamientos con SA, el mutante *cas-c1* mostró menor número de núcleos fluorescentes en el

microscopio confocal que las plantas silvestres, lo cual indica que en las plantas *cas-c1* hay menor cantidad de proteína NPR1 monomérica y por lo tanto funcional en el núcleo. La inmunodetección de NPR1 confirmó este resultado en todas las condiciones analizadas, a pesar de presentar *cas-c1* menor susceptibilidad a los patógenos biótrosos que las plantas silvestres. Estos resultados demostraron que el aumento en la resistencia de *cas-c1* a la infección por patógenos biótrosos no se debe a la monomerización y entrada en el núcleo de la proteína NPR1. Son muchas las proteínas que regulan la ruta de respuesta del SA independientemente de NPR1 y, por tanto, posibles dianas del cianuro, como SNI1, SSI2 o GRXC9 (Herrera-Vásquez et al., 2015; Zhang et al., 2018). Se ha demostrado que la expresión de los genes de respuesta temprana a SA es independiente de NPR1 (Blanco et al., 2005; Blanco et al., 2009). La expresión de la glutatión S-transferasa GST6 y la glucosil-transferasa IEGT también parecen inducirse por SA independientemente de NPR1 (Uquillas et al., 2004). Se cree que la ruta de regulación independiente de NPR1 depende de la familia de factores de transcripción WHY (Desveaux et al., 2005; Vlot et al., 2009). Nuestros resultados muestran una estabilización de la proteína NPR1 tras los tratamientos con SA, tanto en su forma monomérica como oligomérica, quizás debido a su interacción directa con la proteína NPR1 o bien evitando su degradación por parte de los parálogos NPR3 y NPR4 (Fu et al., 2012). En la inmunodetección de NPR1 también se observó que en condiciones basales (-SA), la cantidad de proteína NPR1 oligomérica era menor en las plantas *cas-c1* que en las plantas silvestres. Sin embargo, tras el tratamiento (+SA), la cantidad de oligómero detectado, tanto endógeno como de fusión, era más elevada en las plantas *cas-c1* que en las plantas silvestres, lo que sugiere que las plantas mutantes *cas-c1* responden más eficazmente al SA. Este resultado es compatible con nuestra conclusión de que el aumento de resistencia a patógenos biótrosos del mutante *cas-c1* es dependiente de SA.

Así pues, se ha demostrado que el cianuro puede mimetizar la función de la NADPH oxidasa ATRBOHD, probablemente mediante la producción de ROS de origen mitocondrial, y que modula la respuesta a la infección por patógenos biótrosos de una forma dependiente de la acumulación de SA e independiente de la función de la proteína NPR1 (Fig. 46). Las proteínas involucradas en la modulación por cianuro de la respuesta a patógenos biótrosos son aún desconocidas y su identificación constituye una futura línea de investigación de gran interés.

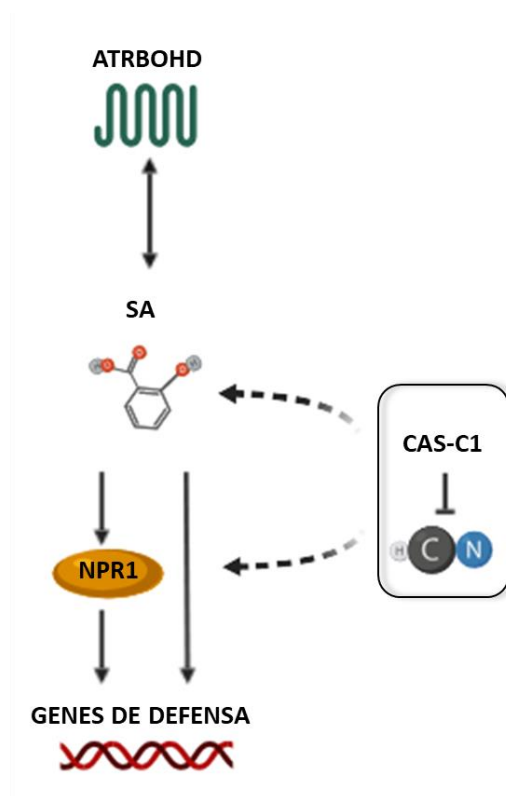


Figura 46. Función reguladora del cianuro en la respuesta a la infección de patógenos biotróficos. Las líneas continuas señalan relaciones ya establecidas y las líneas discontinuas las relaciones propuestas.

3. Mecanismo de acción del cianuro

Uno de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido tratar de esclarecer los mecanismos de acción subyacentes a la regulación por cianuro observada en los dos procesos biológicos estudiados. El cianuro posee una alta afinidad por las metaloproteínas y puede inhibir la citocromo c oxidasa y la cadena de electrones mitocondrial (Antonini et al., 1971; Donato et al., 2007). Aunque la oxidasa alternativa provee una ruta alternativa al transporte de electrones para reducir el oxígeno, esta no está acoplada a síntesis de ATP, por lo que la intoxicación con cianuro está asociada a una reducción en los niveles de ATP (McIntosh, 1994). Dado que el proceso de formación del pelo radical requiere altos niveles de energía, cabía la posibilidad de que el efecto del cianuro en este proceso se limitara a una mera inhibición de la fuente de energía. Sin embargo, tanto resultados previos del grupo que indicaban que la respiración no se encuentra disminuida en el mutante (Garcia et al., 2010) como la determinación de los niveles de ATP realizada en esta tesis doctoral, demuestran que el fenotipo de las plantas *cas-c1* no se debe a una disminución drástica en los niveles de ATP y por tanto a la limitación en la energía disponible en la célula.

Las alteraciones en el desarrollo del pelo radical observada en el mutante tampoco pueden explicarse aparentemente por la interacción del cianuro con metaloproteínas. El control del balance redox en la raíz es crítico para su diferenciación y elongación (Sundaravelpandian et al., 2013). Las ROS producidas por la ferroproteína NADPH oxidasa RHD2 regulan el crecimiento de la raíz; el O_2^- se acumula preferencialmente en la zona de elongación de la raíz y excepcionalmente en la zona meristemática, mientras que el H_2O_2 lo hace en la zona de diferenciación (Dunand et al., 2007; Tsukagoshi et al., 2010). En el pelo radical, tanto el O_2^- como el H_2O_2 favorecen su crecimiento. Ambos se acumulan en la punta de la protuberancia inicial, y esta acumulación se mantiene posteriormente durante la etapa de elongación (Foreman et al., 2003; Carol et al., 2005). A pesar de que el fenotipo de los mutantes *rhd2 cas-c1* y *cas-c1* es indistinguible, solo este último acumula H_2O_2 , demostrando así la independencia de la mutación *cas-c1* de la acumulación de H_2O_2 . Además, si la acumulación de H_2O_2 en los mutantes *cas-c1* y *scn1-1 cas-c1* estuviese relacionado con la formación del pelo radical, ambos mutantes deberían presentar pelos radicales más largos (Dunand et al., 2007; Zhao et al., 2016). El análisis genético realizado en este trabajo indica que CAS-C1 parece actuar en una etapa intermedia entre la acción de SCN1 y la de RHD2, y su función reguladora cadena abajo de SCN1 no está relacionada con la inhibición de la actividad NADPH oxidasa de RHD2 ya que las líneas mutantes *scn1-1* y *scn1-1 cas-c1* muestran niveles equivalentes de acumulación de O_2^- . De igual forma, cuando se analizaron los niveles de actividad NADPH oxidasa en las plantas mutantes *cas-c1*, así como en plantas silvestres tratadas y sin tratar con KCN, no se observó ninguna diferencia en los valores de actividad NADPH oxidasa.

No podemos descartar, sin embargo, que CAS-C1/HCN pudieran ejercer algún efecto inhibitor sobre otras proteínas dianas del anión CN^- . Las peroxidasas participan junto con AtrbohC en el control redox celular (Camejo et al., 2016). Generalmente, las peroxidasas catalizan la reducción del H_2O_2 hasta H_2O pero también pueden producir H_2O_2 , O_2 y OH^- tomando electrones de moléculas donadoras como compuestos fenólicos, precursores de la lignina o auxinas. Así pues, las peroxidasas pueden oxidar varios sustratos en presencia de H_2O_2 y participar en reacciones que inhiben el crecimiento, pero también pueden producir ROS y participar en la relajación de la pared celular y la elongación del pelo radical (Chen and Schopfer, 1999; Schopfer et al., 2002; Liskay et al., 2003; Liskay et al., 2004; Passardi et al., 2004). Los valores de actividad peroxidasa en raíces medidas en este trabajo no presentan variaciones en el mutante *cas-c1* con respecto a las plantas silvestres, así como tampoco en los mutantes dobles *scn1-1 cas-c1* y *rhd2 cas-c1* con respecto a los mutantes simples parentales,

scn1-1 y *rhb2*. Los resultados obtenidos desvinculan de nuevo el papel regulador del cianuro en el proceso de formación del pelo radical del estado redox celular.

Otro modo de acción del cianuro se basa en la reactividad química de esta molécula con alquil disulfuros. El anión CN^- puede atacar nucleofílicamente los puentes disulfuros de la cistina o los puentes disulfuros de las proteínas para formar tiocianatos, dando lugar a residuos de cisteína cianilada. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado la existencia de una nueva modificación post-traducciona en plantas, la *S*-cianilación (García et al., 2019). Tanto el método químico de la 2- iminotiazolidina como el análisis por espectrometría de masas de extractos proteicos de raíces de plantas silvestres tratadas con ACC detectaron la existencia de esta modificación. Sin embargo, el número de proteínas *S*-cianiladas identificadas fue limitado y la mayoría de ellas eran proteínas abundantes, involucradas en procesos biosintéticos primarios. Muchas modificaciones post-traduccionales como la carbonilación, la nitrosilación, la persulfuración o la nitración, cuentan con métodos de marcaje químico o con anticuerpos específicos utilizados para su aislamiento e identificación (Alvarez et al., 2011; Moller et al., 2011; Zhang et al., 2014; Aroca et al., 2015; Aroca et al., 2017), pero en el caso de esta modificación, que nunca antes había sido descrita en ningún organismo, no existen de momento métodos de enriquecimiento específico. Para solventar este problema, se abordaron dos estudios subproteómicos tanto en fracciones enriquecidas en mitocondrias como en células aisladas de pelos radicales, con objeto de dilucidar los mecanismos que inducen los fenotipos observados en el mutante *cas-c1*.

El análisis proteómico realizado en fracciones mitocondriales identificó en el mutante *cas-c1* cambios en la abundancia de proteínas de procesos involucrados en las fases iniciales del desarrollo del pelo radical, como las GTPasas y enzimas que modifican la pared celular (Grierson et al., 2014). En este grupo se incluyen las proteínas RAB GTPasas, que destacan por su papel en la regulación del tráfico vesicular (Nielsen et al., 2008). Dado que la expansión del pelo radical depende del tráfico de componentes celulares hacia la punta del pelo radical, los cambios en la composición y/o actividad de las proteínas RAB GTPasas puede provocar defectos en la formación o movimiento de estas vesículas secretoras. En el mutante *cas-c1* se identificaron, además, proteínas involucradas en la biosíntesis de lignina para la formación de la pared celular. Así pues, en el mutante *cas-c1* podría acumularse lignina impidiendo así la relajación de la pared celular necesaria para el crecimiento apical del pelo radical (Mendrinna and Persson, 2015). En el mutante *cas-c1* se acumulan además, las peroxidasas 7, 16, 23, 27, 32, 44, 45 y 49. Como se ha indicado en el apartado anterior, las peroxidasas pueden oxidar

varios sustratos en presencia de H_2O_2 y participar en reacciones que inhiben el crecimiento, pero también pueden producir ROS y participar en la relajación de la pared celular y elongación del pelo radical (Chen and Schopfer, 1999; Schopfer et al., 2002; Liskay et al., 2003; Liskay et al., 2004; Passardi et al., 2004). Por otra parte, los datos transcriptómicos previos de raíces (García et al., 2010) muestran una represión de varios genes relacionados con la formación del pelo radical. Entre estos genes encontramos a *MRH5*, *MRH6* y *XTR9*, así como otras proteínas que participan en la expansión y morfogénesis de la epidermis de la raíz. En conjunto, estos resultados transcriptómicos y proteómicos son consistentes con una regulación del cianuro de la formación del pelo radical alterando la dinámica de la pared celular propia del crecimiento apical y evitando así la elongación del pelo radical. Esta posibilidad concuerda con el fenotipo de ausencia de pelos radicales observado en el mutante *cas-c1*.

Otro proceso en el que el cianuro presenta un papel fisiológico es la respuesta a patógenos (Chivasa and Carr, 1998; Seo et al., 2011; García et al., 2013). En la clasificación GO de las proteínas ausentes y menos abundantes en el mutante *cas-c1* con respecto a las plantas silvestres destacan las proteínas que participan en señalización, donde se encuentra un grupo de 26 proteínas de la familia RLK, receptores que intervienen en procesos de desarrollo y de respuesta a patógenos (Tang et al., 2017). Además, hay otras proteínas involucradas en estrés biótico que sufren cambios en el mutante *cas-c1* como los factores de transcripción POSF21 y WRKY52/RRS1, que confieren resistencia a *Ralstonia solanacearum* (Williams et al., 2014), y podrían explicar la mayor sensibilidad del mutante *cas-c1* a los hongos necrótrofos. En la ruta de respuesta a hongos necrótrofos interviene el factor de transcripción MYC2, regulado por las enzimas desubiquitinadoras UBP12 y UBP13 (Jeong et al., 2017), ambas sobrerrepresentadas en el mutante *cas-c1*. La mutación *cas-c1* también induce la acumulación de otro grupo de proteínas que incluye a MAC3B, un componente del complejo asociado a MOS4 que regula la respuesta a patógenos a través de NPR1 (Monaghan et al., 2009).

En las muestras enriquecidas en proteínas mitocondriales se identificaron 11 proteínas *S*-cianiladas. Las proteínas tubulina α 2-6 (TBA2-6) y peroxidasa 59/69 (PER59/PER69) se encuentran *S*-cianiladas únicamente en el mutante *cas-c1*. La tubulina es una proteína globular dimerica que da origen a los microtúbulos. Estos, junto con los microfilamentos de actina y los filamentos intermedios participan en la organización del citoesqueleto celular. Los microtúbulos mantienen el gradiente de Ca^{2+} en la punta del pelo radical y controlan la dirección de crecimiento del pelo (Datta et al., 2011). Los tratamientos con compuestos que inhiben o estabilizan los microtúbulos como la orizalina o el taxol, provocan defectos en la

formación y orientación de los pelos radicales (Sieberer et al., 2002; Grierson et al., 2014). La *S*-cianilación de la tubulina podría afectar a la polimerización de los microtúbulos, contribuyendo al fenotipo de ausencia de pelos radicales del mutante *cas-c1*. Recientemente, se ha descrito que la modificación de la Cys²⁸⁷ de la actina 2 por persulfuración resulta en la depolarización de los filamentos de F-actina y la inhibición en el crecimiento del pelo radical (Li et al., 2018), por lo que el citoesqueleto parece ser esencial en el crecimiento de dicha estructura.

Por otra parte, las peroxidasas participan en la respuesta a estreses oxidativos, ya que catalizan la reducción del H₂O₂ hasta OH⁻ tomando electrones de moléculas donadoras (Hiraga et al., 2001; Passardi et al., 2004). PER59/69 poseen 8 residuos de cisteínas formando 4 puentes disulfuros que mantienen su estructura funcional (Mirza et al., 2000). La adición de un residuo de cianuro a alguno de estos puentes disulfuros podrían desestructurar la conformación de la proteína e inhibir la actividad, contribuyendo a la acumulación de H₂O₂ detectada en la raíz del mutante *cas-c1*. Aunque las determinaciones de actividad GPX en raíces realizadas durante esta tesis doctoral no mostraron diferencias en el mutante *cas-c1* con respecto a las plantas silvestres, hay que señalar que ambos genes presentan unos niveles de expresión muy bajos en raíces (base de datos TAIR).

La proteína cisteín-proteasa RD21 fue detectada como *S*-cianilada en todas las réplicas *cas-c1* pero solo en una réplica silvestre. Esta proteína participa en la defensa a la infección por hongos y promueve la muerte celular programada (Balakireva and Zamyatnin, 2018). Los mutantes *rd21* no muestran ningún efecto cuando se infectan con *P. syringae*; sin embargo, son más susceptibles a hongos necrótrofos como *B. cinerea*, demostrando que RD21 proporciona inmunidad a los hongos necrótrofos (Shindo et al., 2012). RD21 es una proteína rica en cisteína y 10 de los 21 residuos de su secuencia forman 5 puentes disulfuros estructurales esenciales, susceptibles de ser *S*-cianilados. Esta proteína está muy regulada post-traduccionamente (Gu et al., 2012), por lo que cambios en su estructura producidos por la *S*-cianilación podrían inhibir su actividad proteolítica, lo que explicaría la mayor sensibilidad del mutante *cas-c1* al hongo necrótrofo *B. cinerea* (Garcia et al., 2013).

El análisis proteómico realizado en células aisladas de pelos radicales ha aportado datos funcionales adicionales de la proteína CAS-C1. En este estudio se identificaron más de 3700 proteínas en cada una de las muestras, de las cuales 457 se identificaron en las muestras *cas-c1* pero no en las silvestres, demostrando que la supresión de la actividad CAS-C1 y la

consiguiente acumulación de cianuro en el mutante *cas-c1* provoca importantes cambios en el proteoma del pelo radical (Garcia et al., 2010; Arenas-Alfonseca et al., 2018).

El análisis de estas 457 proteínas mediante la base de datos KEEG mostró una sobre-representación de las proteínas implicadas en la ruta del espliceosoma, la de transporte de RNA y la ruta de supervisión del mRNA. El espliceosoma es un gran complejo formado por pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) (Lorkovic et al., 2000) que procesan los intrones en el pre-mRNA para convertirlo en el mRNA maduro, etapa fundamental en la expresión génica en eucariotas. En este proceso intervienen también proteínas de unión al RNA, ATPasas dependientes de RNA, helicasas de RNA y proteínas quinasas. En pelos radicales del mutante *cas-c1* se identificaron varias helicasas de RNA (AT1G27900; ESP3, AT1G32490), proteínas de unión al RNA (SR30, AT1G09140; AT2G02570; emb2444, AT2G18510; AT5G12190), y otras proteínas involucradas en el procesamiento de intrones del mRNA. Muchas de las proteínas del espliceosoma, identificadas exclusivamente en *cas-c1*, participan en diversos procesos de desarrollo. La sobreexpresión de SR30, una proteína con dominios de unión al RNA y de interacción proteína-proteína, provoca severos defectos morfológicos y de desarrollo, incluyendo floración tardía, dominancia apical reducida, y cambios en el tamaño de las hojas y la roseta (Lopato et al., 1999). De igual forma, alteraciones en los niveles de expresión de U2AF35, una proteína clave en el reconocimiento del extremo 3' del pre-mRNA, causan fenotipos pleiotrópicos que incluyen defectos en el tiempo de floración, en la morfología de la hoja y en la forma de la flor y la silicua (Wang and Brendel, 2006). PRL1, una proteína nuclear de la familia WD-40, regula la respuesta a glucosa y hormonas en *Arabidopsis* (Németh et al., 1998). Por otra parte, las proteínas ALY participan como adaptadoras en la salida de los mRNA desde el núcleo hasta el citoplasma. Defectos en el transporte nucleocitosólico provocan defectos en el crecimiento y desarrollo de la planta (Pfaff et al., 2018). Un estudio profundo de la expresión génica en células específicas de raíz mostró una gran variación en la presencia de RNAs con regiones intergénicas no codificantes que contribuyen a la especialización funcional de la célula, demostrando que el procesamiento alternativo de intrones sirve para regular la diferenciación (Li et al., 2016). Está además bien establecido que el procesamiento alternativo de intrones controla numerosos procesos en la planta como el ritmo circadiano, el tiempo de floración o la respuesta a señales medioambientales (Szakonyi and Duque, 2018). Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales estos estímulos regulan el procesamiento alternativo de intrones no son conocidos. En nuestro trabajo existen evidencias de que CAS-C1/HCN podría participar en la integración

respuestas hormonales (etileno) o metabólicas con la regulación de proteínas implicadas en el espliceosoma o el procesamiento y transporte de RNA.

Una de las proteínas susceptible de ser modificada por *S*-cianilación es la proteína Transportín 1 (TRN1), identificada en el proteoma de células de pelos radicales, que contiene 22 residuos de cisteína en su secuencia. TRN1 forma parte de complejo del poro nuclear, implicado en el transporte de proteínas y RNAs al núcleo, y sirve como receptor de las secuencias de localización nuclear (NLS). TRN1 interacciona con varias nucleoporinas que conforman el complejo del poro nuclear para el transporte de RNA, así como con proteínas de unión al RNA involucradas en el procesamiento de intrones (Yan et al., 2016), ambos procesos sobre-representados en las proteínas identificadas exclusivamente en los primordios de los pelos radicales *cas-cl*. En *Arabidopsis*, se ha demostrado que TRN1 es el receptor nuclear de GRP7 (*Glycine-rich RNA-binding protein 7*) y es capaz de interactuar con AGO1 (*Argonaute 1*) y de esta forma regular la actividad de miRNA (Cui et al., 2016). Otra proteína constituyente del complejo del poro nuclear e identificada en los primordios de pelo radical del mutante *cas-cl* es SEH1, una proteína clave en el tráfico vesicular (Lee et al., 2006), que es un proceso de suma importancia en el desarrollo del pelo radical. Estos resultados muestran que el splicing del mRNA y su correcto transporte al núcleo son críticos para el correcto desarrollo de la planta.

En esta tesis doctoral se ha profundizado en la función del cianuro en la regulación de los procesos de formación del pelo radical y la respuesta inmune frente a patógenos biótros, dependiente de SA, en la planta *A. thaliana*. El cianuro regula el desarrollo del pelo radical en etapas muy tempranas de su desarrollo, entre la acción de SCN1 y la producción de O_2^- por parte de la NADPH oxidasa RHD2. Además, esta regulación es independiente de ROS y de la actividad NADPH oxidasa de RHD2. En la respuesta a patógenos biótros modulada por SA, el cianuro mimetiza la función productora de ROS de la NADPH oxidasa RHD2 y modula la respuesta a la infección por patógenos biótros de una forma dependiente de la acumulación de SA e independiente de la función de la proteína NPR1. La regulación de ambos procesos podría llevarse a cabo a través de la modificación post-traducciona de proteínas mediante la *S*-cianilación de residuos de cisteína. Los resultados proteómicos obtenidos son compatibles con esta hipótesis aunque no podemos descartar que existan otros mecanismos de acción del cianuro en procesos de señalización.

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas del trabajo realizado a lo largo de esta tesis doctoral se detallan a continuación:

1. El cianuro regula el desarrollo del pelo radical en etapas muy tempranas de su desarrollo, entre la acción de SCN1 y la producción de O_2^- por parte de la NADPH oxidasa ATRBOHC/RHD2. Esta regulación es independiente de ROS y de la actividad NADPH oxidasa de ATRBOHC/RHD2.
2. El cianuro regula positivamente la respuesta a patógenos biótrosos mimetizando la función de la NADPH oxidasa ATRBOHD. Esta regulación es dependiente de la acumulación de SA e independiente de la función de la proteína NPR1.
3. El cianuro intracelular modifica post-traduccionamente algunas proteínas mediante una nueva modificación post-traducciona, la *S*-cianilación, y puede constituir uno de los mecanismos de acción de esta molécula en la regulación del proceso de desarrollo del pelo radical y la respuesta inmune frente a patógenos biótrosos, así como de otros procesos biológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam AL, Nagy ZA, Katay G, Mergenthaler E, Viczian O** (2018) Signals of Systemic Immunity in Plants: Progress and Open Questions. *Int J Mol Sci* **19**
- Adams DO, Yang SF** (1979) Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 170-174
- Akkerman M, Franssen-Verheijen MA, Immerzeel P, Hollander LD, Schel JH, Emons AM** (2012) Texture of cellulose microfibrils of root hair cell walls of *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, and *Vicia sativa*. *J Microsc* **247**: 60-67
- Akopyan TN, Braunstein AE, Goryachenkova EV** (1975) Beta-cyanoalanine synthase: purification and characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 1617-1621
- Aleksandrov A, Field M** (2013) Mechanism of activation of elongation factor Tu by ribosome: catalytic histidine activates GTP by protonation. *Rna* **19**: 1218-1225
- Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR** (1999) EIN2, a Bifunctional Transducer of Ethylene and Stress Responses in *Arabidopsis*. **284**: 2148-2152
- Alvarez C, Calo L, Romero LC, Garcia I, Gotor C** (2010) An O-acetylserine(thiol)lyase homolog with L-cysteine desulfhydrase activity regulates cysteine homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **152**: 656-669
- Alvarez C, García I, Romero LC, Gotor C** (2012) Mitochondrial Sulfide Detoxification Requires a Functional Isoform O-Acetylserine(thiol)lyase C in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **5**: 1217-1226
- Alvarez C, Lozano-Juste J, Romero LC, Garcia I, Gotor C, Leon J** (2011) Inhibition of *Arabidopsis* O-acetylserine(thiol)lyase A1 by tyrosine nitration. *J Biol Chem* **286**: 578-586
- Andreae MO, Merlet P** (2001) Emission of trace gases and aerosols from biomass burning. *In* *Global Biogeochemical Cycles*, Vol 15, pp 955-966
- Antonini E, Brunori M, Greenwood C, Malmstrom BG, Rotilio GC** (1971) The interaction of cyanide with cytochrome oxidase. *Eur J Biochem* **23**: 396-400
- Arenas-Alfonseca L, Gotor C, Romero LC, Garcia I** (2018) β -Cyanoalanine Synthase Action in Root Hair Elongation is Exerted at Early Steps of the Root Hair Elongation Pathway and is Independent of Direct Cyanide Inactivation of NADPH Oxidase. *Plant Cell Physiol* **59**: 1072-1083
- Aroca A, Benito JM, Gotor C, Romero LC** (2017) Persulfidation proteome reveals the regulation of protein function by hydrogen sulfide in diverse biological processes in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **68**: 4915-4927
- Aroca A, Gotor C, Romero LC** (2018) Hydrogen Sulfide Signaling in Plants: Emerging Roles of Protein Persulfidation. *Front Plant Sci* **9**: 1369
- Aroca Á, Serna A, Gotor C, Romero LC** (2015) S-Sulfhydration: A Cysteine Posttranslational Modification in Plant Systems. *Plant Physiology* **168**: 334-342
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J** (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**: 977-983
- ATSDR** (1997) Toxicological profile for cyanide. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *In* *USDOHAH SERVICES, PH Service, AftSaD Registry*, eds, Atlanta, Georgia
- Balakireva AV, Zamyatnin AA** (2018) Indispensable Role of Proteases in Plant Innate Immunity. *Int J Mol Sci* **19**
- Bari R, Jones JD** (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* **69**: 473-488
- Barroso C, Vega JM, Gotor C** (1995) A new member of the cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **363**: 1-5

- Belhaj K, Lin B, Mauch F** (2009) The chloroplast protein RPH1 plays a role in the immune response of Arabidopsis to *Phytophthora brassicae*. *Plant J* **58**: 287-298
- Bermudez MA, Paez-Ochoa MA, Gotor C, Romero LC** (2010) Arabidopsis S-sulfocysteine synthase activity is essential for chloroplast function and long-day light-dependent redox control. *Plant Cell* **22**: 403-416
- Birkenbihl RP, Diezel C, Somssich IE** (2012) Arabidopsis WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant Physiol* **159**: 266-285
- Bisson MM, Groth G** (2010) New insight in ethylene signaling: autokinase activity of ETR1 modulates the interaction of receptors and EIN2. *Mol Plant* **3**: 882-889
- Bisson MM, Groth G** (2015) Targeting Plant Ethylene Responses by Controlling Essential Protein-Protein Interactions in the Ethylene Pathway. *Mol Plant* **8**: 1165-1174
- Blanco F, Garretón V, Frey N, Dominguez C, Pérez-Acle T, Van der Straeten D, Jordana X, Holuigue LJPMB** (2005) Identification of NPR1-Dependent and Independent Genes Early Induced by Salicylic Acid Treatment in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **59**: 927-944
- Blanco F, Salinas P, Cecchini NM, Jordana X, Van Hummelen P, Alvarez ME, Holuigue L** (2009) Early genomic responses to salicylic acid in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **70**: 79-102
- Bleecker AB, Kende H** (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 1-18
- Blom D, Fabbri C, Eberl L, Weisskopf L** (2011) Volatile-mediated killing of Arabidopsis thaliana by bacteria is mainly due to hydrogen cyanide. *Appl Environ Microbiol* **77**: 1000-1008
- Bonner ER, Cahoon RE, Knapke SM, Jez JM** (2005) Molecular basis of cysteine biosynthesis in plants: structural and functional analysis of O-acetylserine sulfhydrylase from Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **280**: 38803-38813
- Borch K, Bouma TJ, Lynch JP, Brown KM** (1999) Ethylene: a regulator of root architectural responses to soil phosphorus availability. *Plant Cell Environ* **22**: 425-431
- Borowitz JL, Gunasekar PG, Isom GE** (1997) Hydrogen cyanide generation by mu-opiate receptor activation: possible neuromodulatory role of endogenous cyanide. *Brain Res* **768**: 294-300
- Borron SW, Baud FJ, Megarbane B, Bismuth C** (2007) Hydroxocobalamin for severe acute cyanide poisoning by ingestion or inhalation. *Am J Emerg Med* **25**: 551-558
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ** (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**: 21-30
- Brady SM, Song S, Dhugga KS, Rafalski JA, Benfey PN** (2007) Combining expression and comparative evolutionary analysis. The COBRA gene family. *Plant Physiol* **143**: 172-187
- Bruex A, Kainkaryam RM, Wieckowski Y, Kang YH, Bernhardt C, Xia Y, Zheng X, Wang JY, Lee MM, Benfey P, Woolf PJ, Schiefelbein J** (2012) A gene regulatory network for root epidermis cell differentiation in Arabidopsis. *PLoS Genet* **8**: e1002446
- Bubb MR, Baines IC, Korn ED** (1998) Localization of actobindin, profilin I, profilin II, and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) in *Acanthamoeba castellanii*. *In Cytoskeleton*, Vol 39, pp 134-146
- Buchanan B, Gruissem W, Jones RL** (2000) Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiology, Rockville, Maryland.
- Buxdorf K, Rahat I, Gafni A, Levy M** (2013) The epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* induces jasmonic acid- and salicylic acid/nonexpressor of PR1-independent local and systemic resistance. *Plant Physiol* **161**: 2014-2022
- Camejo D, Guzman-Cedeno A, Moreno A** (2016) Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiol Biochem* **103**: 10-23

- Canales J, Contreras-López O, Álvarez JM, Gutiérrez RA** (2017) Nitrate induction of root hair density is mediated by TGA1/TGA4 and CPC transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **92**: 305-316
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X** (1997) The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**: 57-63
- Carol RJ, Dolan L** (2002) Building a hair: tip growth in *Arabidopsis thaliana* root hairs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**: 815-821
- Carol RJ, Takeda S, Linstead P, Durrant MC, Kakesova H, Derbyshire P, Drea S, Zarsky V, Dolan L** (2005) A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature* **438**: 1013-1016
- Castellano JM, Vioque B** (2002) Characterisation of the ACC oxidase activity in transgenic auxin overproducing tomato during ripening. *Plant Growth Regulation* **38**: 203-208
- Castelló MJ, Medina-Puche L, Lamilla J, Tornero P** (2018) NPR1 paralogs of *Arabidopsis* and their role in salicylic acid perception. *PLoS One* **13**: e0209835
- Catsimpooulas N, Wood JL** (1966) Specific cleavage of cystine peptides by cyanide. *J Biol Chem* **241**: 1790-1796
- Chaouch S, Queval G, Noctor G** (2012) AtRbohF is a crucial modulator of defence-associated metabolism and a key actor in the interplay between intracellular oxidative stress and pathogenesis responses in *Arabidopsis*. *Plant J* **69**: 613-627
- Chen R, Jiang H, Li L, Zhai Q, Qi L, Zhou W, Liu X, Li H, Zheng W, Sun J, Li C** (2012) The *Arabidopsis* mediator subunit MED25 differentially regulates jasmonate and abscisic acid signaling through interacting with the MYC2 and ABI5 transcription factors. *Plant Cell* **24**: 2898-2916
- Chen SX, Schopfer P** (1999) Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *Eur J Biochem* **260**: 726-735
- Chen YC, Holmes EC, Rajniak J, Kim JG, Tang S, Fischer CR, Mudgett MB, Sattely ES** (2018) N-hydroxy-pipecolic acid is a mobile metabolite that induces systemic disease resistance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: E4920-e4929
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nurnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497-500
- Chivasa S, Carr JP** (1998) Cyanide restores N gene-mediated resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco expressing salicylic acid hydroxylase. *Plant Cell* **10**: 1489-1498
- Cho H-T, Cosgrove DJ** (2002) Regulation of Root Hair Initiation and Expansin Gene Expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 3237-3253
- Choi HW, Klessig DF** (2016) DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC plant biology* **16**: 232-232
- Chowdhury N, Bagchi A** (2017) Structural Insight into the Gene Expression Profiling of the hcn Operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Biochem Biotechnol* **182**: 1144-1157
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743
- Cooper CE, Brown GC** (2008) The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *J Bioenerg Biomembr* **40**: 533-539
- Corbineau F, El-Maarouf-Bouteau H, Bailly C, Oracz K, Bogatek R** (2008) Release of sunflower seed dormancy by cyanide: cross-talk with ethylene signalling pathway. *J Exp Bot* **59**: 2241-2251
- Cui H, Qiu J, Zhou Y, Bhandari DD, Zhao C, Bautor J, Parker JE** (2018) Antagonism of Transcription Factor MYC2 by EDS1/PAD4 Complexes Bolsters Salicylic Acid Defense in *Arabidopsis* Effector-Triggered Immunity. *Mol Plant* **11**: 1053-1066
- Cui S, Suzuki T, Tominaga-Wada R, Yoshida S** (2018) Regulation and functional diversification of root hairs. *Semin Cell Dev Biol* **83**: 115-122

- Cui Y, Fang X, Qi Y** (2016) TRANSPORTIN1 Promotes the Association of MicroRNA with ARGONAUTE1 in Arabidopsis. *Plant Cell* **28**: 2576-2585
- Dat JF, Pellinen R, Beeckman T, Van De Cotte B, Langebartels C, Kangasjarvi J, Inze D, Van Breusegem F** (2003) Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant J* **33**: 621-632
- Datta S, Kim C, Pernas M, Pires N, Proust H, Tam T, Vijayakumar P, Dolan L** (2011) Root hairs: development, growth and evolution at the plant-soil interface. *Plant and Soil* **346**: 1-14
- Datta S, Prescott H, Dolan L** (2015) Intensity of a pulse of RSL4 transcription factor synthesis determines Arabidopsis root hair cell size. *Nature Plants* **1**: 15138
- Dean JV, Mohammed LA, Fitzpatrick T** (2005) The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta* **221**: 287-296
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588
- Desveaux D, Marechal A, Brisson N** (2005) Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond. *Trends Plant Sci* **10**: 95-102
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M** (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 441
- Ding Y, Sun T, Ao K, Peng Y, Zhang Y, Li X, Zhang Y** (2018) Opposite Roles of Salicylic Acid Receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in Transcriptional Regulation of Plant Immunity. *Cell* **173**: 1454-1467.e1415
- Dodds PN, Rathjen JP** (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* **11**: 539-548
- Donato DB, Nichols O, Possingham H, Moore M, Ricci PF, Noller BN** (2007) A critical review of the effects of gold cyanide-bearing tailings solutions on wildlife. *Environ Int* **33**: 974-984
- Duan Q, Kita D, Li C, Cheung AY, Wu HM** (2010) FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 17821-17826
- Dubiella U, Seybold H, Durian G, Komander E, Lassig R, Witte CP, Schulze WX, Romeis T** (2013) Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 8744-8749
- Dunand C, Crevecoeur M, Penel C** (2007) Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in Arabidopsis root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytol* **174**: 332-341
- Favery B, Ryan E, Foreman J, Linstead P, Boudonck K, Steer M, Shaw P, Dolan L** (2001) KOJAK encodes a cellulose synthase-like protein required for root hair cell morphogenesis in Arabidopsis. *Genes Dev* **15**: 79-89
- Feng Y, Xu P, Li B, Li P, Wen X, An F, Gong Y, Xin Y, Zhu Z, Wang Y, Guo H** (2017) Ethylene promotes root hair growth through coordinated EIN3/EIL1 and RHD6/RSL1 activity in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: 13834-13839
- Fernandez-Calvo P, Chini A, Fernandez-Barbero G, Chico JM, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM, Pauwels L, Witters E, Puga MI, Paz-Ares J, Goossens A, Reymond P, De Jaeger G, Solano R** (2011) The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* **23**: 701-715
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, Dolan L** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442-446
- Fromm S, Going J, Lorenz C, Peterhansel C, Braun HP** (2016) Depletion of the "gamma-type carbonic anhydrase-like" subunits of complex I affects central mitochondrial metabolism in Arabidopsis thaliana. *Biochim Biophys Acta* **1857**: 60-71

- Fu ZQ, Dong X** (2013) Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 839-863
- Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, Mohan R, Spoel SH, Tada Y, Zheng N, Dong X** (2012) NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* **486**: 228
- Ganguly A, DeMott L, Zhu C, McClosky DD, Anderson CT, Dixit R** (2018) Importin-beta Directly Regulates the Motor Activity and Turnover of a Kinesin-4. *Dev Cell* **44**: 642-651.e645
- Gao QM, Venugopal S, Navarre D, Kachroo A** (2011) Low oleic acid-derived repression of jasmonic acid-inducible defense responses requires the WRKY50 and WRKY51 proteins. *Plant Physiol* **155**: 464-476
- García I, Arenas-Alfonseca L, Moreno I, Gotor C, Romero LC** (2019) HCN regulates cellular processes through posttranslational modification of proteins by S-cyanylation. *Plant Physiol* **179**: 107-123
- García I, Castellano JM, Vioque B, Solano R, Gotor C, Romero LC** (2010) Mitochondrial beta-cyanoalanine synthase is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**: 3268-3279
- García I, Gotor C, Romero LC** (2014) Beyond toxicity: a regulatory role for mitochondrial cyanide. *Plant Signal Behav* **9**: e27612
- García I, Gotor C, Romero LC** (2015) Cysteine homeostasis. In JPF D'Mello, ed, *Amino Acids in Higher Plants*. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom, pp 219-233
- García I, Rosas T, Bejarano ER, Gotor C, Romero LC** (2013) Transient transcriptional regulation of the CYS-C1 gene and cyanide accumulation upon pathogen infection in the plant immune response. *Plant Physiol* **162**: 2015-2027
- García MJ, Suárez V, Romera FJ, Alcántara E, Pérez-Vicente R** (2011) A new model involving ethylene, nitric oxide and Fe to explain the regulation of Fe-acquisition genes in Strategy I plants. *Plant Physiol Biochem* **49**: 537-544
- Gawron O, Fernando J** (1961) Kinetics of the Cyanide-Cystine Reaction. *Journal of the American Chemical Society* **83**: 2906-2908
- Geng X, Jin L, Shimada M, Kim MG, Mackey D** (2014) The phytotoxin coronatine is a multifunctional component of the virulence armament of *Pseudomonas syringae*. *Planta* **240**: 1149-1165
- Gohre V, Robatzek S** (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol* **46**: 189-215
- González-Fontes A, Martín-Rejano EM, Rexach J, Herrera-Rodríguez MB, Navarro-Gochicoa MT, Camacho-Cristóbal JJ** (2015) Boron deficiency inhibits root cell elongation via an ethylene/auxin/ROS-dependent pathway in *Arabidopsis* seedlings. *J Exp Bot* **66**: 3831-3840
- Gotor C, Laureano-Marín AM, Arenas-Alfonseca L, Moreno I, Aroca Á, García I, Romero LC** (2017) Advances in Plant Sulfur Metabolism and Signaling. In FM Cánovas, U Lüttge, R Matyssek, eds, *Progress in Botany Vol. 78*. Springer International Publishing, Cham, pp 45-66
- Grant MR, Godiard L, Straube E, Ashfield T, Lewald J, Sattler A, Innes RW, Dangl JL** (1995) Structure of the *Arabidopsis* RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* **269**: 843-846
- Griebel T, Zeier J** (2008) Light regulation and daytime dependency of inducible plant defenses in *Arabidopsis*: phytochrome signaling controls systemic acquired resistance rather than local defense. *Plant Physiol* **147**: 790-801
- Grierson C, Nielsen E, Ketelaarc T, Schiefelbein J** (2014) Root hairs. *Arabidopsis Book* **12**: e0172
- Grierson C, Schiefelbein J** (2009) Genetics of Root Hair Formation. In AMC Emons, T Ketelaar, eds, *Root Hairs*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 1-25
- Gruner K, Griebel T, Návarová H, Attaran E, Zeier J** (2013) Reprogramming of plants during systemic acquired resistance. *Front Plant Sci* **4**
- Gu C, Shabab M, Strasser R, Wolters PJ, Shindo T, Niemer M, Kaschani F, Mach L, van der Hoorn RA** (2012) Post-translational regulation and trafficking of the granulin-containing protease RD21 of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **7**: e32422

- Gunasekar PG, Borowitz JL, Turek JJ, Van Horn DA, Isom GE** (2000) Endogenous generation of cyanide in neuronal tissue: Involvement of a peroxidase system. *J Neurosci Res* **61**: 570-575
- Gunasekar PG, Prabhakaran K, Li L, Zhang L, Isom GE, Borowitz JL** (2004) Receptor mechanisms mediating cyanide generation in PC12 cells and rat brain. *Neurosci Res* **49**: 13-18
- Gupta KJ, Fernie AR, Kaiser WM, van Dongen JT** (2011) On the origins of nitric oxide. *Trends Plant Sci* **16**: 160-168
- Hall AH, Dart R, Bogdan G** (2007) Sodium thiosulfate or hydroxocobalamin for the empiric treatment of cyanide poisoning? *Ann Emerg Med* **49**: 806-813
- Hatzfeld Y, Maruyama A, Schmidt A, Noji M, Ishizawa K, Saito K** (2000) beta-Cyanoalanine synthase is a mitochondrial cysteine synthase-like protein in spinach and Arabidopsis. *Plant Physiol* **123**: 1163-1171
- Hayashi S, Ishii T, Matsunaga T, Tominaga R, Kuromori T, Wada T, Shinozaki K, Hirayama T** (2008) The glycerophosphoryl diester phosphodiesterase-like proteins SHV3 and its homologs play important roles in cell wall organization. *Plant Cell Physiol* **49**: 1522-1535
- Heath MC** (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* **44**: 321-334
- Heeg C, Kruse C, Jost R, Gutensohn M, Ruppert T, Wirtz M, Hell R** (2008) Analysis of the Arabidopsis O-acetylserine(thiol)lyase gene family demonstrates compartment-specific differences in the regulation of cysteine synthesis. *Plant Cell* **20**: 168-185
- Heiling S, Schuman MC, Schoettner M, Mukerjee P, Berger B, Schneider B, Jassbi AR, Baldwin IT** (2010) Jasmonate and ppHsystemin Regulate Key Malonylation Steps in the Biosynthesis of 17-Hydroxygeranyllinalool Diterpene Glycosides, an Abundant and Effective Direct Defense against Herbivores in *Nicotiana attenuata*. *Plant Cell* **22**: 273-292
- Herrera-Vásquez A, Carvallo L, Blanco F, Tobar M, Villarreal-Candia E, Vicente-Carbajosa J, Salinas P, Holuigue LJPMBR** (2015) Transcriptional Control of Glutaredoxin GRXC9 Expression by a Salicylic Acid-Dependent and NPR1-Independent Pathway in Arabidopsis. *Plant Mol Biol Report* **33**: 624-637
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H** (2001) A large family of Class III plant peroxidases. *In* *Plant Cell Physiol*, Vol 42, pp 462-468
- Honkanen S, Dolan L** (2016) Growth regulation in tip-growing cells that develop on the epidermis. *Curr Opin Plant Biol* **34**: 77-83
- Hückelhoven R** (2007) Cell Wall–Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annu Rev Phytopathol* **45**: 101-127
- Hucklesby DP, Dowling MJ, Hewitt EJP** (1982) Cyanide formation from glyoxylate and hydroxylamine catalysed by extracts of higher-plant leaves. *Planta* **156**: 487-491
- Hwang Y, Choi H-S, Cho H-M, Cho H-T** (2017) Tracheophytes Contain Conserved Orthologs of a Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor That Modulate ROOT HAIR SPECIFIC Genes. *Plant Cell* **29**: 39-53
- Ishikawa K, Yoshimura K, Harada K, Fukusaki E, Ogawa T, Tamoi M, Shigeoka S** (2010) AtNUDX6, an ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase in Arabidopsis, positively regulates NPR1-dependent salicylic acid signaling. *Plant Physiol* **152**: 2000-2012
- Iwai T, Miyasaka A, Seo S, Ohashi Y** (2006) Contribution of ethylene biosynthesis for resistance to blast fungus infection in young rice plants. *Plant Physiol* **142**: 1202-1215
- Jeong JS, Jung C, Seo JS, Kim JK, Chua NH** (2017) The Deubiquitinating Enzymes UBP12 and UBP13 Positively Regulate MYC2 Levels in Jasmonate Responses. *Plant Cell* **29**: 1406-1424
- Johnson C, Boden E, Arias J** (2003) Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**: 1846-1858
- Johnson WR, Kan JC** (1971) Mechanisms of hydrogen cyanide formation from the pyrolysis of amino acids and related compounds. *J Org Chem* **36**: 189-192
- Jones AR, Kramer EM, Knox K, Swarup R, Bennett MJ, Lazarus CM, Leyser HM, Grierson CS** (2009) Auxin transport through non-hair cells sustains root-hair development. *Nat Cell Biol* **11**: 78-84

- Jones JD, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329
- Jones MA, Raymond MJ, Yang Z, Smirnov N** (2007) NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase. *J Exp Bot* **58**: 1261-1270
- Jost R, Berkowitz O, Wirtz M, Hopkins L, Hawkesford MJ, Hell R** (2000) Genomic and functional characterization of the oas gene family encoding O-acetylserine (thiol) lyases, enzymes catalyzing the final step in cysteine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **253**: 237-247
- Ju C, Chang C** (2015) Mechanistic Insights in Ethylene Perception and Signal Transduction. *Plant Physiol* **169**: 85-95
- Jung J-Y, Shin R, Schachtman DP** (2009) Ethylene Mediates Response and Tolerance to Potassium Deprivation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 607-621
- Jungk A** (2001) Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. *J Plant Nutr Soil Sci* **164**: 121-129
- Kang YH, Song SK, Schiefelbein J, Lee MM** (2013) Nuclear trapping controls the position-dependent localization of CAPRICE in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **163**: 193-204
- Kapos P, Devendrakumar KT, Li X** (2019) Plant NLRs: From discovery to application. *Plant Science* **279**: 3-18
- Kaundal A, Rojas CM, Mysore KS** (2012) Measurement of NADPH Oxidase Activity in Plants. *Bio-protocol* **2**: e278
- Kazan K, Manners JM** (2012) JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends Plant Sci* **17**: 22-31
- Keeling CI, Bohlmann J** (2006) Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytol* **170**: 657-675
- Kende H** (1993) Ethylene Biosynthesis. *Annu Rev of Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 283-307
- Ketelaar T** (2013) The actin cytoskeleton in root hairs: all is fine at the tip. *Curr Opin Plant Biol* **16**: 749-756
- Ketelaar T, Galway ME, Mulder BM, Emons AM** (2008) Rates of exocytosis and endocytosis in *Arabidopsis* root hairs and pollen tubes. *J Microsc* **231**: 265-273
- Kinkema M, Fan W, Dong X** (2000) Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell* **12**: 2339-2350
- Klie S, Nikoloski Z** (2012) The Choice between MapMan and Gene Ontology for Automated Gene Function Prediction in Plant Science. *Frontiers in Genetics* **3**: 115
- Knowles CJ** (1976) Microorganisms and cyanide. *Bacteriol Rev* **40**: 652-680
- Kotchoni SO, Gachomo EW** (2006) The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *J Biosci* **31**: 389-404
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2940-2945
- Kwak SH, Schiefelbein J** (2008) A feedback mechanism controlling SCRAMBLED receptor accumulation and cell-type pattern in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **18**: 1949-1954
- Kwak SH, Shen R, Schiefelbein J** (2005) Positional signaling mediated by a receptor-like kinase in *Arabidopsis*. *Science* **307**: 1111-1113
- Lai KW, Yau CP, Tse YC, Jiang L, Yip WK** (2009) Heterologous expression analyses of rice OsCAS in *Arabidopsis* and in yeast provide evidence for its roles in cyanide detoxification rather than in cysteine synthesis in vivo. *J Exp Bot* **60**: 993-1008
- Lawton K, Weymann K, Friedrich L, Vernooij B, Uknes S, Ryals J** (1995) Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Mol Plant Microbe Interact* **8**: 863-870
- Lee HI, Raskin I** (1998) Glucosylation of Salicylic Acid in *Nicotiana tabacum* Cv. Xanthi-nc. *Phytopathology* **88**: 692-697

- Lee HJ, Park YJ, Seo PJ, Kim JH, Sim HJ, Kim SG, Park CM** (2015) Systemic Immunity Requires SnRK2.8-Mediated Nuclear Import of NPR1 in Arabidopsis. *Plant Cell* **27**: 3425-3438
- Lee MH, Lee SH, Kim H, Jin JB, Kim DH, Hwang I** (2006) A WD40 repeat protein, Arabidopsis Sec13 homolog 1, may play a role in vacuolar trafficking by controlling the membrane association of AtDRP2A. *Mol Cells* **22**: 210-219
- León J, Sánchez-Serrano JJ** (1999) Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiol Biochem* **37**: 373-380
- Li FJ, Xu ZS, Soo AD, Lun ZR, He CY** (2017) ATP-driven and AMPK-independent autophagy in an early branching eukaryotic parasite. *Autophagy* **13**: 715-729
- Li J, Chen S, Wang X, Shi C, Liu H, Yang J, Shi W, Guo J, Jia H** (2018) Hydrogen Sulfide Disturbs Actin Polymerization via S-Sulfhydration Resulting in Stunted Root Hair Growth. *Plant Physiol* **178**: 936-949
- Li Q, Lancaster JR, Jr.** (2013) Chemical foundations of hydrogen sulfide biology. *Nitric Oxide* **35**: 21-34
- Li S, Yamada M, Han X, Ohler U, Benfey PN** (2016) High-Resolution Expression Map of the Arabidopsis Root Reveals Alternative Splicing and lincRNA Regulation. *Dev Cell* **39**: 508-522
- Liang W-S** (2003) Drought stress increases both cyanogenesis and β -cyanoalanine synthase activity in tobacco. *Plant Science* **165**: 1109-1115
- Liang X, Ding P, Lian K, Wang J, Ma M, Li L, Li L, Li M, Zhang X, Chen S, Zhang Y, Zhou JM** (2016) Arabidopsis heterotrimeric G proteins regulate immunity by directly coupling to the FLS2 receptor. *Elife* **5**: e13568
- Lin CC, Wong BK, Burgey CS, Gibson CR, Singh R** (2005) In vitro metabolism of a thrombin inhibitor and quantitation of metabolically generated cyanide. *J Pharm Biomed Anal* **39**: 1014-1020
- Lindermayr C, Sell S, Muller B, Leister D, Durner J** (2010) Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of Arabidopsis thaliana by nitric oxide. *Plant Cell* **22**: 2894-2907
- Liszkay A, Kenk B, Schopfer P** (2003) Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* **217**: 658-667
- Liszkay A, van der Zalm E, Schopfer P** (2004) Production of reactive oxygen intermediates ($O_2^{(-)}$, H_2O_2 , and $(\cdot)OH$) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol* **136**: 3114-3123
- Liu L, Sonbol F-M, Huot B, Gu Y, Withers J, Mwimba M, Yao J, He SY, Dong X** (2016) Salicylic acid receptors activate jasmonic acid signalling through a non-canonical pathway to promote effector-triggered immunity. *Nat Commun* **7**: 13099
- Liu PP, von Dahl CC, Klessig DF** (2011) The extent to which methyl salicylate is required for signaling systemic acquired resistance is dependent on exposure to light after infection. *Plant Physiol* **157**: 2216-2226
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* **25**: 402-408
- Lopato S, Kalyna M, Dorner S, Kobayashi R, Krainer AR, Barta A** (1999) atSRp30, one of two SF2/ASF-like proteins from Arabidopsis thaliana, regulates splicing of specific plant genes. *Genes Dev* **13**: 987-1001
- Lorkovic ZJ, Wieczorek Kirk DA, Lambermon MH, Filipowicz W** (2000) Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends Plant Sci* **5**: 160-167
- Luna E, Bruce TJA, Roberts MR, Flors V, Ton J** (2012) Next-Generation Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiol* **158**: 844-853
- Machingura M, Salomon E, Jez JM, Ebbs SD** (2016) The beta-cyanoalanine synthase pathway: beyond cyanide detoxification. *Plant Cell Environ* **39**: 2329-2341
- Mangano S, Denita-Juarez SP, Choi HS, Marzol E, Hwang Y, Ranocha P, Velasquez SM, Borassi C, Barberini ML, Aptekmann AA, Muschietti JP, Nadra AD, Dunand C, Cho HT, Estevez JM** (2017) Molecular link between auxin and ROS-mediated polar growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: 5289-5294

- Maruyama A, Saito K, Ishizawa KJPMB** (2001) β -Cyanoalanine synthase and cysteine synthase from potato: molecular cloning, biochemical characterization, and spatial and hormonal regulation. *Plant Mol Biol* **46**: 749-760
- Marzol E, Borassi C, Denita Juarez SP, Mangano S, Estevez JM** (2017) RSL4 Takes Control: Multiple Signals, One Transcription Factor. *Trends Plant Sci* **22**: 553-555
- Masucci JD, Schiefelbein JW** (1994) The *rh6* Mutation of *Arabidopsis thaliana* Alters Root-Hair Initiation through an Auxin- and Ethylene-Associated Process. *Plant Physiol* **106**: 1335-1346
- Masucci JD, Schiefelbein JW** (1996) Hormones act downstream of TTG and GL2 to promote root hair outgrowth during epidermis development in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* **8**: 1505-1517
- McIntosh L** (1994) Molecular biology of the alternative oxidase. *Plant Physiol* **105**: 781-786
- Mendrinna A, Persson S** (2015) Root hair growth: it's a one way street. *F1000Prime Rep* **7**: 23
- Meyer T, Burow M, Bauer M, Papenbrock J** (2003) *Arabidopsis* sulfurtransferases: investigation of their function during senescence and in cyanide detoxification. *Planta* **217**: 1-10
- Mi H, Huang X, Muruganujan A, Tang H, Mills C, Kang D, Thomas PD** (2017) PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res* **45**: D183-d189
- Miller JM, Conn EE** (1980) Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants. *Plant Physiol* **65**: 1199-1202
- Miller RN, Costa Alves GS, Van Sluys MA** (2017) Plant immunity: unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Ann Bot* **119**: 681-687
- Mirza O, Henriksen A, Ostergaard L, Welinder KG, Gajhede M** (2000) *Arabidopsis thaliana* peroxidase N: structure of a novel neutral peroxidase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**: 372-375
- Mishina TE, Zeier J** (2007) Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant J* **50**: 500-513
- Miyazaki JH, Yang SF** (1987) The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiol Plant* **69**: 366-370
- Mohnen D, Tierney ML** (2011) Plants Get Hyp to O-Glycosylation. *Science* **332**: 1393-1394
- Molendijk AJ, Bischoff F, Rajendrakumar CS, Friml J, Braun M, Gilroy S, Palme K** (2001) *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *EMBO J* **20**: 2779-2788
- Moller IM, Rogowska-Wrzesinska A, Rao RS** (2011) Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *J Proteomics* **74**: 2228-2242
- Monaghan J, Xu F, Gao M, Zhao Q, Palma K, Long C, Chen S, Zhang Y, Li X** (2009) Two Prp19-like U-box proteins in the MOS4-associated complex play redundant roles in plant innate immunity. *PLoS Pathog* **5**: e1000526
- Monshausen GB, Bibikova TN, Messerli MA, Shi C, Gilroy S** (2007) From the Cover: Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 20996-21001
- Monshausen GB, Bibikova TN, Messerli MA, Shi C, Gilroy S** (2007) Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 20996-21001
- Montillet JL, Chamnongpol S, Rusterucci C, Dat J, van de Cotte B, Agnel JP, Battesti C, Inze D, Van Breusegem F, Triantaphylides C** (2005) Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiol* **138**: 1516-1526
- Moro CF, Gaspar M, da Silva FR, Pattathil S, Hahn MG, Salgado I, Braga MR** (2017) S-nitrosoglutathione promotes cell wall remodelling, alters the transcriptional profile and induces root hair formation in the hairless root hair defective 6 (*rh6*) mutant of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **213**: 1771-1786

- Mou Z, Fan W, Dong X** (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**: 935-944
- Moussatche P, Klee HJ** (2004) Autophosphorylation activity of the Arabidopsis ethylene receptor multigene family. *J Biol Chem* **279**: 48734-48741
- Mur LA, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C** (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol* **140**: 249-262
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Nagahara N, Ito T, Minami M** (1999) Mercaptopyruvate sulfurtransferase as a defense against cyanide toxication: molecular properties and mode of detoxification. *Histol Histopathol* **14**: 1277-1286
- Németh K, Salchert K, Putnoky P, Bhalerao R, Koncz-Kálmán Z, Stankovic-Stangeland B, Bakó L, Mathur J, Okrész L, Stabel S, Geigenberger P, Stitt M, Rédei GP, Schell J, Koncz C** (1998) Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in Arabidopsis. *Genes Dev* **12**: 3059-3073
- Nersissian AM, Immoos C, Hill MG, Hart PJ, Williams G, Herrmann RG, Valentine JS** (1998) Uclacyanins, stellacyanins, and plantacyanins are distinct subfamilies of phytoeyanins: plant-specific mononuclear blue copper proteins. *Protein Sci* **7**: 1915-1929
- Nielsen E, Cheung AY, Ueda T** (2008) The regulatory RAB and ARF GTPases for vesicular trafficking. *Plant Physiol* **147**: 1516-1526
- Nishitani K, Tominaga R** (1992) Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J Biol Chem* **267**: 21058-21064
- O'Leary B, Preston GM, Sweetlove LJ** (2014) Increased β -Cyanoalanine Nitrilase Activity Improves Cyanide Tolerance and Assimilation in Arabidopsis. *Mol Plant* **7**: 231-243
- Ogasawara Y, Kaya H, Hiraoka G, Yumoto F, Kimura S, Kadota Y, Hishinuma H, Senzaki E, Yamagoe S, Nagata K, Nara M, Suzuki K, Tanokura M, Kuchitsu K** (2008) Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca^{2+} and phosphorylation. *J Biol Chem* **283**: 8885-8892
- Ono E, Wong HL, Kawasaki T, Hasegawa M, Kodama O, Shimamoto K** (2001) Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 759-764
- Ortea I, Ruiz-Sanchez I, Canete R, Caballero-Villarraso J, Canete MD** (2018) Identification of candidate serum biomarkers of childhood-onset growth hormone deficiency using SWATH-MS and feature selection. *J Proteomics* **175**: 105-113
- Papenbrock J, Schmidt A** (2000) Characterization of two sulfurtransferase isozymes from Arabidopsis thaliana. *Eur J Biochem* **267**: 5571-5579
- Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF** (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* **318**: 113-116
- Parker JS, Cavell AC, Dolan L, Roberts K, Grierson CS** (2000) Genetic interactions during root hair morphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 1961-1974
- Passardi F, Penel C, Dunand C** (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci* **9**: 534-540
- Pei W, Du F, Zhang Y, He T, Ren H** (2012) Control of the actin cytoskeleton in root hair development. *Plant Sci* **187**: 10-18
- Petricka JJ, Schauer MA, Megraw M, Breakfield NW, Thompson JW, Georgiev S, Soderblom EJ, Ohler U, Moseley MA, Grossniklaus U, Benfey PN** (2012) The protein expression landscape of the Arabidopsis root. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 6811-6818
- Pfaff C, Ehrnsberger HF, Flores-Tornero M, Sørensen BB, Schubert T, Längst G, Griesenbeck J, Sprunck S, Grasser M, Grasser KD** (2018) ALY RNA-Binding Proteins Are Required for

- Nucleocytoplasmic mRNA Transport and Modulate Plant Growth and Development. *Plant Physiol* **177**: 226-240
- Picmanova M, Neilson EH, Motawia MS, Olsen CE, Agerbirk N, Gray CJ, Flitsch S, Meier S, Silvestro D, Jorgensen K, Sanchez-Perez R, Moller BL, Bjarnholt N** (2015) A recycling pathway for cyanogenic glycosides evidenced by the comparative metabolic profiling in three cyanogenic plant species. *Biochem J* **469**: 375-389
- Pieterse CM, Van Loon LC** (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 456-464
- Piotrowski M, Schonfelder S, Weiler EW** (2001) The *Arabidopsis thaliana* isogene NIT4 and its orthologs in tobacco encode beta-cyano-L-alanine hydratase/nitrilase. *J Biol Chem* **276**: 2616-2621
- Poulton JE** (1990) Cyanogenesis in Plants. *Plant Physiol* **94**: 401-405
- Qi J, Wang J, Gong Z, Zhou JM** (2017) Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* **38**: 92-100
- R. Lew R** (1998) Immediate and steady state extracellular ionic fluxes of growing *Arabidopsis thaliana* root hairs under hyperosmotic and hypoosmotic conditions. *Physiol Plant* **104**: 397-404
- Rairdan GJ, Collier SM, Sacco MA, Baldwin TT, Boettrich T, Moffett P** (2008) The Coiled-Coil and Nucleotide Binding Domains of the Potato Rx Disease Resistance Protein Function in Pathogen Recognition and Signaling. *Plant Cell* **20**: 739-751
- Rasmussen JB, Hammerschmidt R, Zook MN** (1991) Systemic Induction of Salicylic Acid Accumulation in Cucumber after Inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol* **97**: 1342-1347
- Rate DN, Greenberg JT** (2001) The *Arabidopsis* aberrant growth and death2 mutant shows resistance to *Pseudomonas syringae* and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. *Plant J* **27**: 203-211
- Rehman HM, Shah ZH, Nawaz MA, Ahmad MQ, Yang SH, Kho KH, Chung G** (2017) RETRACTED ARTICLE: Beta-cyanoalanine synthase pathway as a homeostatic mechanism for cyanide detoxification as well as growth and development in higher plants. *Planta* **245**: 235
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE** (2000) Differential Gene Expression in Response to Mechanical Wounding and Insect Feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 707-719
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D** (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**: 929-967
- Romera FJ, Alcantara E, De La Guardia MD** (1999) Ethylene Production by Fe-deficient Roots and its Involvement in the Regulation of Fe-deficiency Stress Responses by Strategy I Plants. *Annals of Botany* **83**: 51-55
- Rudrappa T, Splaine RE, Biedrzycki ML, Bais HP** (2008) Cyanogenic pseudomonads influence multitrophic interactions in the rhizosphere. *PLoS One* **3**: e2073
- Saijo Y, Loo EP, Yasuda S** (2018) Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions. *Plant J* **93**: 592-613
- Saleh A, Withers J, Mohan R, Marqués J, Gu Y, Yan S, Zavaliev R, Nomoto M, Tada Y, Dong X** (2015) Posttranslational Modifications of the Master Transcriptional Regulator NPR1 Enable Dynamic but Tight Control of Plant Immune Responses. *Cell Host & Microbe* **18**: 169-182
- Santner A, Estelle M** (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* **459**: 1071-1078
- Savage N, Yang TJ, Chen CY, Lin KL, Monk NA, Schmidt W** (2013) Positional signaling and expression of ENHANCER OF TRY AND CPC1 are tuned to increase root hair density in response to phosphate deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **8**: e75452
- Schoenaers S, Balcerowicz D, Breen G, Hill K, Zdanio M, Mouille G, Holman TJ, Oh J, Wilson MH, Nikonorova N, Vu LD, De Smet I, Swarup R, De Vos WH, Pintelon I, Adriaensen D, Grierson**

- C, Bennett MJ, Vissenberg K** (2018) The Auxin-Regulated CrRLK1L Kinase ERULUS Controls Cell Wall Composition during Root Hair Tip Growth. *Curr Biol* **28**: 722-732.e726
- Schopfer P, Liskay A, Bechtold M, Frahy G, Wagner A** (2002) Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* **214**: 821-828
- Schulze B, Mentzel T, Jehle AK, Mueller K, Beeler S, Boller T, Felix G, Chinchilla D** (2010) Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *J Biol Chem* **285**: 9444-9451
- Seo S, Mitsuhashi I, Feng J, Iwai T, Hasegawa M, Ohashi Y** (2011) Cyanide, a coproduct of plant hormone ethylene biosynthesis, contributes to the resistance of rice to blast fungus. *Plant Physiol* **155**: 502-514
- Shindo T, Misas-Villamil JC, Horger AC, Song J, van der Hoorn RA** (2012) A role in immunity for Arabidopsis cysteine protease RD21, the ortholog of the tomato immune protease C14. *PLoS One* **7**: e29317
- Sieberer BJ, Ketelaar T, Esseling JJ, Emons AM** (2005) Microtubules guide root hair tip growth. *New Phytol* **167**: 711-719
- Sieberer BJ, Timmers AC, Lhuissier FG, Emons AM** (2002) Endoplasmic microtubules configure the subapical cytoplasm and are required for fast growth of *Medicago truncatula* root hairs. *Plant Physiol* **130**: 977-988
- Siegel LM** (1965) A DIRECT MICRODETERMINATION FOR SULFIDE. *Anal Biochem* **11**: 126-132
- Solomonson L.P SAM** (1981) Glyoxylate and cyanide formation. In *Cyanide in Biology*, London
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Metraux JP, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X, Pieterse CM** (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15**: 760-770
- Stannard JN, Horecker BL** (1948) The in vitro inhibition of cytochrome oxidase by azide and cyanide. *J Biol Chem* **172**: 599-608
- Stelmazynska T** (1986) Formation of HCN and its chlorination to ClCN by stimulated human neutrophils--2. Oxidation of thiocyanate as a source of HCN. *Int J Biochem* **18**: 1107-1114
- Struglics A, Fredlund KM, Rasmusson AG, Møller IM** (1993) The presence of a short redox chain in the membrane of intact potato tuber peroxisomes and the association of malate dehydrogenase with the peroxisomal membrane. *Physiol Plant* **88**: 19-28
- Stulen I, Israelstam GF, Oaks AJ** (1979) Enzymes of asparagine synthesis in maize roots. *Planta* **146**: 237-241
- Subrahmanian N, Remacle C, Hamel PP** (2016) Plant mitochondrial Complex I composition and assembly: A review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1857**: 1001-1014
- Sundaravelpandian K, Chandrika N, Tsai YH, Schmidt W** (2013) PFT1-controlled ROS balance is critical for multiple stages of root hair development in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* **8**: e24066
- Sundaravelpandian K, Chandrika NN, Schmidt W** (2013) PFT1, a transcriptional Mediator complex subunit, controls root hair differentiation through reactive oxygen species (ROS) distribution in Arabidopsis. *New Phytol* **197**: 151-161
- Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA, Mittler R** (2011) Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 691-699
- Swanson J, Kearney B, Dahlbeck D, Staskawicz BJ** (1988) Cloned avirulence gene of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* complements spontaneous race change mutant. *Mol Plant Microbe Interact* **1**: 5-9
- Swiderski MR, Birker D, Jones JD** (2009) The TIR domain of TIR-NB-LRR resistance proteins is a signaling domain involved in cell death induction. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 157-165
- Szakonyi D, Duque P** (2018) Alternative Splicing as a Regulator of Early Plant Development. *Front Plant Sci* **9**: 1174

- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C** (2015) STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* **43**: D447-452
- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X** (2008) Plant Immunity Requires Conformational Changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science* **321**: 952-956
- Takahashi H, Saito K** (1996) Subcellular Localization of Spinach Cysteine Synthase Isoforms and Regulation of Their Gene Expression by Nitrogen and Sulfur. *Plant Physiol* **112**: 273-280
- Tang D, Wang G, Zhou J-M** (2017) Receptor Kinases in Plant-Pathogen Interactions: More Than Pattern Recognition. *The Plant Cell* **29**: 618-637
- Terron-Camero LC, Molina-Moya E, Sanz-Fernandez M, Sandalio LM, Romero-Puertas MC** (2018) Detection of Reactive Oxygen and Nitrogen Species (ROS/RNS) During Hypersensitive Cell Death. *Methods Mol Biol* **1743**: 97-105
- Thole JM, Vermeer JE, Zhang Y, Gadella TW, Jr., Nielsen E** (2008) Root hair defective4 encodes a phosphatidylinositol-4-phosphate phosphatase required for proper root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**: 381-395
- Thoma I, Loeffler C, Sinha AK, Gupta M, Kriskche M, Steffan B, Roitsch T, Mueller MJ** (2003) Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J* **34**: 363-375
- Tornero P, Dangl JL** (2001) A high-throughput method for quantifying growth of phytopathogenic bacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **28**: 475-481
- Torres MA** (2010) ROS in biotic interactions. *Physiol Plant* **138**: 414-429
- Torres MA, Dangl JL, Jones JD** (2002) *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 517-522
- Torres MA, Jones JD, Dangl JL** (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* **141**: 373-378
- Tsuda K, Katagiri F** (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 459-465
- Tsui MM, York JD** (2010) Roles of inositol phosphates and inositol pyrophosphates in development, cell signaling and nuclear processes. *Adv Enzyme Regul* **50**: 324-337
- Tsukagoshi H, Busch W, Benfey PN** (2010) Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* **143**: 606-616
- Uquillas C, Letelier I, Blanco F, Jordana X, Holuigue L** (2004) NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 34-42
- Verhage A, Vlaardingerbroek I, Raaymakers C, Van Dam NM, Dicke M, Van Wees SC, Pieterse CM** (2011) Rewiring of the Jasmonate Signaling Pathway in *Arabidopsis* during Insect Herbivory. *Front Plant Sci* **2**: 47
- Vetter J** (2000) Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon* **38**: 11-36
- Vianello A, Zancani M, Nagy G, Macrì F** (1997) Guaiacol peroxidase associated to soybean root plasma membranes oxidizes ascorbate. *Plant Physiol* **150**: 573-577
- Vidal G, Ribas-Carbo M, Garmier M, Dubertret G, Rasmusson AG, Mathieu C, Foyer CH, De Paepe R** (2007) Lack of Respiratory Chain Complex I Impairs Alternative Oxidase Engagement and Modulates Redox Signaling during Elicitor-Induced Cell Death in Tobacco. *Plant Cell* **19**: 640-655
- Vijayakumar P, Datta S, Dolan L** (2016) ROOT HAIR DEFECTIVE SIX-LIKE4 (RSL4) promotes root hair elongation by transcriptionally regulating the expression of genes required for cell growth. *New Phytologist* **212**: 944-953
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF** (2009) Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* **47**: 177-206

- Vlot AC, Dempsey DMA, Klessig DF** (2009) Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 177-206
- Wagner ES, Davis RE** (1966) Displacement Reactions. IX. The Reaction of Cyanide Ion with Cystine. An Example of Amino Group Participation as Detected with Nitrogen-15 during Cleavage of a Sulfur-Sulfur Bond. *Journal of the American Chemical Society* **88**: 7-12
- Wang B-B, Brendel V** (2006) Molecular characterization and phylogeny of U2AF35 homologs in plants. *Plant Physiol* **140**: 624-636
- Wang D, Amornsiripanitch N, Dong X** (2006) A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog* **2**: e123
- Wang KLC, Li H, Ecker JR** (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* **14**: S131-S151
- Wang Q, Fristedt R, Yu X, Chen Z, Liu H, Lee Y, Guo H, Merchant SS, Lin C** (2012) The γ -Carbonic Anhydrase Subcomplex of Mitochondrial Complex I Is Essential for Development and Important for Photomorphogenesis of Arabidopsis. **160**: 1373-1383
- Wang S, Barron C, Schiefelbein J, Chen JG** (2010) Distinct relationships between GLABRA2 and single-repeat R3 MYB transcription factors in the regulation of trichome and root hair patterning in Arabidopsis. *New Phytol* **185**: 387-400
- Wasternack C** (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* **100**: 681-697
- Wawrzynska A, Rodibaugh NL, Innes RW** (2010) Synergistic activation of defense responses in Arabidopsis by simultaneous loss of the GSL5 callose synthase and the EDR1 protein kinase. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 578-584
- Wen X, Zhang C, Ji Y, Zhao Q, He W, An F, Jiang L, Guo H** (2012) Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell Res* **22**: 1613-1616
- Williams SJ, Sohn KH, Wan L, Bernoux M, Sarris PF, Segonzac C, Ve T, Ma Y, Saucet SB, Ericsson DJ, Casey LW, Lonhienne T, Winzor DJ, Zhang X, Coerdet A, Parker JE, Dodds PN, Kobe B, Jones JD** (2014) Structural basis for assembly and function of a heterodimeric plant immune receptor. *Science* **344**: 299-303
- Won S-K, Lee Y-J, Lee H-Y, Heo Y-K, Cho M, Cho H-T** (2009) cis-Element- and Transcriptome-Based Screening of Root Hair-Specific Genes and Their Functional Characterization in Arabidopsis. *Plant Physiol* **150**: 1459-1473
- Wurtele ES, Nikolau BJ, Conn EE** (1984) Tissue Distribution of beta-Cyanoalanine Synthase in Leaves. *Plant Physiol* **75**: 979-982
- Wurtele ES, Nikolau BJ, Conn EE** (1985) Subcellular and Developmental Distribution of beta-Cyanoalanine Synthase in Barley Leaves. *Plant Physiol* **78**: 285-290
- Yaeno T, Matsuda O, Iba K** (2004) Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *Plant J* **40**: 931-941
- Yamada K, Nagano AJ, Ogasawara K, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (2009) The ER body, a new organelle in Arabidopsis thaliana, requires NAI2 for its formation and accumulates specific beta-glucosidases. *Plant Signal Behav* **4**: 849-852
- Yamada K, Yamaguchi K, Shirakawa T, Nakagami H, Mine A, Ishikawa K, Fujiwara M, Narusaka M, Narusaka Y, Ichimura K, Kobayashi Y, Matsui H, Nomura Y, Nomoto M, Tada Y, Fukao Y, Fukamizo T, Tsuda K, Shirasu K, Shibuya N, Kawasaki T** (2016) The Arabidopsis CERK1-associated kinase PBL27 connects chitin perception to MAPK activation. *EMBO J* **35**: 2468-2483
- Yamaguchi Y, Nakamura T, Kusano T, Sano H** (2000) Three Arabidopsis genes encoding proteins with differential activities for cysteine synthase and beta-cyanoalanine synthase. *Plant Cell Physiol* **41**: 465-476

- Yamamoto S, Katagiri M, Maeno H, Hayaishi O** (1965) SALICYLATE HYDROXYLASE, A MONOOXYGENASE REQUIRING FLAVIN ADENINE DINUCLEOTIDE. I. PURIFICATION AND GENERAL PROPERTIES. *J Biol Chem* **240**: 3408-3413
- Yan B, Wang X, Wang Z, Chen N, Mu C, Mao K, Han L, Zhang W, Liu H** (2016) Identification of potential cargo proteins of transportin protein AtTRN1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* **35**: 629-640
- Yang NC, Ho WM, Chen YH, Hu ML** (2002) A convenient one-step extraction of cellular ATP using boiling water for the luciferin-luciferase assay of ATP. *Anal Biochem* **306**: 323-327
- Yi H, Juergens M, Jez JM** (2012) Structure of soybean beta-cyanoalanine synthase and the molecular basis for cyanide detoxification in plants. *Plant Cell* **24**: 2696-2706
- Yi K, Menand B, Bell E, Dolan L** (2010) A basic helix-loop-helix transcription factor controls cell growth and size in root hairs. *Nat Genet* **42**: 264-267
- Yoo CM, Quan L, Cannon AE, Wen J, Blancaflor EB** (2012) AGD1, a class 1 ARF-GAP, acts in common signaling pathways with phosphoinositide metabolism and the actin cytoskeleton in controlling *Arabidopsis* root hair polarity. *Plant J* **69**: 1064-1076
- Yu X-Z, Lu P-C, Yu Z** (2012) On the role of beta-cyanoalanine synthase (CAS) in metabolism of free cyanide and ferri-cyanide by rice seedlings. *Ecotoxicology* **21**: 548-556
- Zagrobelny M, Bak S, Olsen CE, Moller BL** (2007) Intimate roles for cyanogenic glucosides in the life cycle of *Zygaena filipendulae* (Lepidoptera, Zygaenidae). *Insect Biochem Mol Biol* **37**: 1189-1197
- Zagrobelny M, de Castro ECP, Moller BL, Bak S** (2018) Cyanogenesis in Arthropods: From Chemical Warfare to Nuptial Gifts. *Insects* **9**
- Zdor RE** (2015) Bacterial cyanogenesis: impact on biotic interactions. *J Appl Microbiol* **118**: 267-274
- Zeier J, Pink B, Mueller MJ, Berger S** (2004) Light conditions influence specific defence responses in incompatible plant-pathogen interactions: uncoupling systemic resistance from salicylic acid and PR-1 accumulation. *Planta* **219**: 673-683
- Zemlyanskaya EV, Omelyanchuk NA, Ubogoeva EV, Mironova VV** (2018) Deciphering Auxin-Ethylene Crosstalk at a Systems Level. *Int J Mol Sci* **19**
- Zhang D, Macinkovic I, Devarie-Baez NO, Pan J, Park CM, Carroll KS, Filipovic MR, Xian M** (2014) Detection of protein S-sulfhydration by a tag-switch technique. *Angew Chem Int Ed Engl* **53**: 575-581
- Zhang W, Zhao F, Jiang L, Chen C, Wu L, Liu Z** (2018) Different Pathogen Defense Strategies in *Arabidopsis*: More than Pathogen Recognition. *Cells* **7**
- Zhao P, Sokolov LN, Ye J, Tang CY, Shi J, Zhen Y, Lan W, Hong Z, Qi J, Lu GH, Pandey GK, Yang YH** (2016) The LIKE SEX FOUR2 regulates root development by modulating reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *Sci Rep* **6**: 28683
- Zhao Q, Guo HW** (2011) Paradigms and paradox in the ethylene signaling pathway and interaction network. *Mol Plant* **4**: 626-634
- Zhu C, Ganguly A, Baskin TI, McClosky DD, Anderson CT, Foster C, Meunier KA, Okamoto R, Berg H, Dixit R** (2015) The Fragile Fiber1 Kinesin Contributes to Cortical Microtubule-Mediated Trafficking of Cell Wall Components. *Plant Physiol* **167**: 780-792
- Zhu Z, An F, Feng Y, Li P, Xue L, A M, Jiang Z, Kim J-M, To TK, Li W, Zhang X, Yu Q, Dong Z, Chen W-Q, Seki M, Zhou J-M, Guo H** (2011) Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 12539-12544
- Zhu Z, An F, Feng Y, Li P, Xue L, A M, Jiang Z, Kim JM, To TK, Li W, Zhang X, Yu Q, Dong Z, Chen WQ, Seki M, Zhou JM, Guo H** (2011) Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 12539-12544
- Zurbriggen MD, Carrillo N, Tognetti VB, Melzer M, Peisker M, Hause B, Hajirezaei MR** (2009) Chloroplast-generated reactive oxygen species play a major role in localized cell death

during the non-host interaction between tobacco and *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. Plant J **60**: 962-973

